

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultad de Farmacia

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Agrquímica y Tecnología de Alimentos

Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7,
Listeria monocytogenes, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en
alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real

Patricia Elizaquível Bárcenas

Tesis Doctoral

Valencia, 2009

UMI Number: U607776

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607776

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSIDAD DE VALENCIA FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, a esta Tesis doctoral de D. PATRICIA ELIZAVIVEL BARCENAS la calificación de Sobresaliente "cum laude" Valencia, a 6 de Marzo de 2009

El Secretario,

El Presidente,



The image shows two handwritten signatures in blue ink. The signature on the left is large and loops around the official seal. The signature on the right is smaller and more compact. The official seal is circular with the text 'UNIVERSITAT DE VALENCIA' at the top and 'FACULTAT DE FARMACIA' at the bottom. Inside the seal, there is a coat of arms and the text 'ALEXANDER PP VI' and '1499'.

FACULTAT DE FARMÀCIA
VALÈNCIA
BIBLIOTECA
Data d'entrada 26/3-09
Departament TD/FARM 270 (Be)
Registre j 2111455

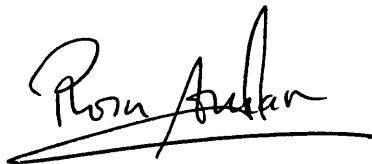
TD-FARM 270

Rosa Aznar Novella, Profesora Titular del departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia y miembro del Claustro Científico ampliado del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC, Valencia)

CERTIFICA:

Que Patricia Elizaquível Bárcenas ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral **“Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real”** en las instalaciones del IATA, dentro de la línea de investigación **“Detección de bacterias en alimentos por técnicas moleculares”** y autoriza la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Burjassot en Enero de 2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rosa Aznar', with a horizontal line underneath.

Dra. Rosa Aznar Novella

El presente trabajo de Tesis se ha realizado dentro del proyecto “Detección automatizada de bacterias patógenas en alimentos mediante PCR a tiempo real (PCR cuantitativa)” financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Ref. PTR1995-0773-OPCT) y de los proyectos “Validación de un sistema de RTi-PCR para la detección automatizada de *Salmonella* en alimentos” (Ref. EVES050/2005) y “Detección simultánea y automatizada de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* mediante RTi-PCR múltiple” (Ref. EVES001/2006) ambos financiados por la Conselleria de Sanidad de la Generalitat Valenciana.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar este trabajo con unas líneas dedicadas a todas aquellas personas que me han acompañado y ayudado a lo largo de estos años y sin las que esta Tesis no habría sido posible.

En primer lugar, tengo que agradecer a Rosa Aznar, directora de esta tesis, la confianza que ha puesto en mi durante todo este tiempo y sobretodo, el haberme transmitido una pequeña parte de su pasión por la investigación cuando yo no tenía claro el camino a seguir.

No puedo olvidar tampoco a algunas personas que han sido imprescindibles para el desarrollo de este trabajo como han sido Jose Antonio Gabaldón, por aportar todas las muestras de alimentos y por su ayuda y colaboración en todo el proyecto y a Fernando López del IATA, Javier López Román de la UCAM y Laura Barrios del CSIC por su ayuda con la estadística.

Quiero agradecer también, a todo el personal del IATA y, en especial, al departamento de Biotecnología, el haberme facilitado las cosas y haber conseguido que mi estancia aquí haya sido tan agradable. En particular quería agradecer a Estefanía, Andrew, Marga, Luisa, Amparo, Teresa, Carmela, Paloma, Patri, Jose Manuel, Salvador y María José su ayuda siempre que la he necesitado y los buenos ratos compartidos en los almuerzos y las sobremesas.

Además, quiero dar las gracias de forma especial a Bea, Empar y M^a Carmen, que me acogieron cuando yo aun era estudiante y me enseñaron a manejarme en el laboratorio. Especialmente Empar con la que compartí los primeros años y de la que aprendí mucho, no solo laboralmente, sino también en el ámbito personal. También a Juan, agradecerle todo lo que me enseñó de la PCR cuantitativa y su ayuda inestimable con todo el papeleo y, por supuesto, las largas conversaciones y los ratos agradables y divertidos compartidos tanto en el laboratorio como fuera de él.

También tengo un recuerdo muy especial de toda aquella gente que ha pasado por el laboratorio 306, (que han sido muchos) y que han hecho que

estos años hallan sido una gran experiencia para mi. Gracias a Alicia, Mapi, Edu, Miriam, Laura, JV, Pepa, Esther, Fátima, Victoria y Pedro. Y a los que me acompañaron durante los primeros años: Roseta, Patri, Pili, Forment, María y Boro.

Tampoco puedo olvidarme de agradecer a la “cuadrilla” actual de becarios y no becarios, que no son sólo compañeros de trabajo sino que se han convertido en amigos con los que compartir muchas mas cosas a parte de lo estrictamente laboral. Muchísimas gracias a Juanan, Oscar, Juan, Esther, Meri, Silvia, Amparo, Jordi, David, Christian, Ricardo, Pedro, Fernando, Aída, Ana y Enric.

Y, por supuesto, tengo que dar las gracias a mis chicas del 306 con las que he trabajado codo con codo. A Ana T. que, aunque ya no está en laboratorio, fue un apoyo imprescindible y se ha convertido en una gran amiga. A Gloria, nuestra más reciente adquisición, por leerse este trabajo. A Montse por ser mi “gran saltamontes” y echarme una mano siempre que me ha hecho falta. A Ali, mi compañera de mesa por permitirme ocupar su espacio sin quejarse demasiado. A María por los “Pi pu” y los “Hiiiiii” y esa felicidad constante que me ha alegrado tantos días. A Guillem por su toque estadístico. Y a Rosana por ser la voz al otro lado del laboratorio, por aguantar mis días buenos y los no tan buenos y por haberse leído esta tesis con tantísimo detalle.

Finalmente, a quienes tengo más que agradecer es a mis padres por la educación y los valores que me han dado en la vida y por su apoyo incondicional y su confianza ciega en mí. Sin ellos este trabajo no habría sido posible. También gracias a mi hermana y a David por vuestros ánimos y apoyo. Y gracias Ney por tener paciencia para soportar mis momentos de tensión y simplemente por estar ahí todo este tiempo.

ÍNDICE

	Página
Certificado	III
Agradecimientos	IX
Índice	XIII
Índice de Tablas	XIX
Índice de Figuras	XXIII
Abreviaturas	XXV
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Patógenos en alimentos: importancia en la salud pública	3
1.1 Contaminación primaria y sus causas	3
1.2 Estrategias de vigilancia y control	7
1.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	9
1.3.1 Otros serotipos	11
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.5 <i>Salmonella</i> spp.	14
1.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2. Detección de patógenos en alimentos	17
2.1 Métodos tradicionales	17
2.2.1 <i>E. coli</i> O157:H7	19
2.2.2 <i>L. monocytogenes</i> .	19
2.2.3 <i>Salmonella</i> spp.	20
2.2.4 <i>Sta. aureus</i>	21
2.2 Técnicas moleculares como alternativa para la detección de patógenos en alimentos	22
3. Técnicas de PCR	24
3.1 PCR convencional	24
3.2 RTi-PCR	25
3.2.1 Sistemas inespecíficos	25
3.2.2 Sistemas específicos: sondas marcadas	27
3.2.2.1 Sistema destructivo o de hidrólisis	27

3.2.2.2 Sistemas no destructivos o de hibridación	28
3.3 PCR múltiple	31
4. Aplicación de la PCR para la detección de patógenos en alimentos	34
5. Limitaciones de las técnicas de PCR	36
5.1 Tamaño de la muestra y niveles de detección	37
5.2 Preparación de la muestra para PCR	37
5.3 Detección de células vivas y muertas	42
5.4 Validación de la PCR como técnica de análisis para la detección de patógenos en alimentos	44
5.5 Controles analíticos	45
II. OBJETIVOS	47
III. MATERIAL Y METODOS	51
1. Cepas utilizadas	53
1.1 Condiciones de cultivo	53
2. Análisis de alimentos	58
2.1 Ensayos de inoculación	58
2.1.1 Preparación de muestras de alimentos	58
2.1.2 Preparación de cultivos para la inoculación	58
2.1.3 Inoculación de las muestras	59
2.1.4 Ensayos con enriquecimiento	60
2.2 Análisis de muestras de contaminación natural	61
3. Extracción de DNA	65
3.1 A partir de cultivos puros	65
3.2 A partir de muestras de alimentos	66
3.2.1 Métodos basados en tratamiento por calor	67
3.2.2 Métodos basados en columnas de purificación	68
4. Cuantificación de ácidos nucleicos	68
4.1 Espectrofotometría	68
4.2 Espectrofluorimetría	69

5. Cebadores y sondas	70
5.1 Selección de cebadores y sondas	70
5.2 Diseño y especificidad de nuevos cebadores para <i>Salmonella</i> spp.	73
6. PCR convencional	73
7. PCR a tiempo real	74
7.1 SYBR Green I	74
7.2 TaqMan	76
7.3 Rectas patrón para cuantificación	76
7.3.1 A partir de DNA	76
7.3.2 A partir de células.	77
7.4 PCR y RTi-PCR de muestras de alimentos	78
8. Mini-VIDAS	78
9. Análisis estadístico	79
9.1 Comparación de los métodos de extracción	79
9.2 Comparación de los resultados de PCR, RTi-PCR y mini-VIDAS	80
9.3 Comparación de los valores de cuantificación	81
IV. RESULTADOS	83
1. Comparación de los métodos de extracción	85
1.1 Sensibilidad de los métodos ensayados	85
1.2 Análisis estadístico	88
1.3 Tiempo y coste del análisis	90
2. Aplicación de la RTi-PCR para la detección de patógenos en alimentos	92
2.1 Especificidad de los cebadores	92
2.2 Sensibilidad de la RTi-PCR en muestras inoculadas	97
2.3 Curvas estándar de cuantificación	98
2.4 Análisis de muestras de contaminación natural por PCR, RTi-PCR y mini-VIDAS	103
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	104
2.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	105
2.4.3 <i>Salmonella</i>	107
2.4.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	109

2.4.5 Análisis global	110
2.5 Cuantificación de las muestras	111
3. Desarrollo de una reacción de RTi-PCR múltiple para la detección de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> spp. y <i>Sta. aureus</i> en alimentos	113
3.1 Diseño de cebadores y sonda específicos para <i>Salmonella</i> spp.	114
3.1.1 Comprobación la especificidad	114
3.1.1.1 <i>In silico</i>	114
3.1.1.2 <i>In vitro</i>	114
3.1.2. Sensibilidad de la RTi-PCR desarrollada para la detección de <i>Salmonella</i>	116
3.2 Optimización de la RTi-PCR múltiple	118
3.3. Comparación RTi-PCR múltiple-simple	121
3.4 Aplicación de la RTi-PCR múltiple en alimentos inoculados	122
3.4.1 Amplificación de concentraciones iguales de los tres patógenos	122
3.4.2 Amplificación de combinaciones de distintas concentraciones de DNA o células de cada uno de los patógenos	123
3.4.3. Detección tras enriquecimiento	127
V. DISCUSIÓN	129
1. Selección de un método de extracción para la detección por PCR de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>Sta. aureus</i> en alimentos	133
2. Evaluación de la RTi-PCR para la detección directa y la cuantificación de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>Sta. aureus</i> en alimentos	138
3. Desarrollo y validación de la reacción de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> spp. y <i>Sta. aureus</i> en alimentos vegetales	145
VI. CONCLUSIONES	153
VII. ANEXOS	159
VIII. BIBLIOGRAFÍA	185

Índice de Tablas

Tabla 1. Agentes causantes de los brotes de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea en 2006. Pág. 7

Tabla 2. Especies, subespecies y serotipos de *Salmonella* y sus hábitats más frecuentes. Pág. 15

Tabla 3. Límites permitidos en distintos tipos de alimentos y método analítico de referencia según las normas EN/ISO. Pág. 18

Tabla 4. Longitud máxima de excitación y emisión para los fluorocromos habitualmente utilizados en RTi-PCR. Pág. 33

Tabla 5. Sistemas de RTi-PCR publicados en los últimos años para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *St. aureus*. Págs. 35 y 36

Tabla 6. Métodos comerciales para la extracción de DNA de bacterias. Págs. 40 y 41.

Tabla 7. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio. Págs. 54-57

Tabla 8. Cantidades inoculadas (ufc/reacción) en los ensayos de sensibilidad de la RTi-PCR múltiple. Pág. 60

Tabla 9. Cebadores y sondas utilizados en este trabajo. Pág. 72

Tabla 10. Tamaño del genoma publicado para los patógenos en estudio. Pág. 77

Tabla 11. Grado de acuerdo en función del valor obtenido para el índice kappa. Pág. 81

Tabla 12. Valores de sensibilidad (ufc/g) obtenidos por PCR específica en vegetales inoculados artificialmente tras la extracción de DNA por los cuatro métodos. Pág. 86

Tabla 13. Valores medios del logaritmo neperiano del límite de detección mostrado por los cuatro métodos de extracción en función de I) patógeno y II) matriz vegetal. Págs. 88-89

Tabla 14. Valores de P para la comparación de los cuatro métodos considerando los efectos de la matriz y de los patógenos de forma conjunta. Pág. 90

Tabla 15. Valores de C_T obtenidos por RTi-PCR en modo TaqMan con los cebadores uidAF/uidAR y la sonda uidAP específicos para *E. coli* O157:H7, en presencia de distintas concentraciones de $MgCl_2$. Pág. 94

Tabla 16. Valores de C_T obtenidos para *S. enterica* spp. *enterica* CECT 915^T por RTi-PCR en modo TaqMan con los cebadores JHOL/JHOR y la sonda JHOP, a las distintas concentraciones de sonda y MgCl₂ ensayadas. Pág. 96

Tabla 17. Valores de C_T obtenidos para los DNA extraídos a partir de las muestras de pimiento verde inoculadas artificialmente. Pág. 98

Tabla 18. Valores de C_T obtenidos para las distintas concentraciones de A) DNA cuantificado y B) Suspensiones celulares calibradas. Pág. 101

Tabla 19. Número de muestras positivas para la presencia de *E. coli* O157:H7 por RTi-PCR y mini-VIDAS. Pág. 104

Tabla 20. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *E. coli* O157:H7 obtenidos para la RTi-PCR y mini-VIDAS. Pág. 105

Tabla 21. Número de muestras positivas para la presencia de *L. monocytogenes* por RTi-PCR y del mini-VIDAS. Pág. 106

Tabla 22. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *L. monocytogenes* obtenidos para la RTi-PCR y mini-VIDAS LMO. Pág. 107

Tabla 23. Número de muestras positivas para la presencia de *Salmonella* spp. por RTi-PCR y por mini-VIDAS en el CTC. Pág. 108

Tabla 24. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *Salmonella* spp. obtenidos para la RTi-PCR y mini-VIDAS. Pág. 108

Tabla 25. Número de muestras positivas para la presencia de *Sta. aureus* por RTi-PCR (Lab2) y por el método de cultivo (Lab1). Pág. 109

Tabla 26. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *Sta. aureus* obtenidos para la RTi-PCR (Lab2) y para el método de cultivo (Lab1). Pág. 110

Tabla 27. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos globales para la RTi-PCR y para el mini-VIDAS. Pág. 111

Tabla 28. Niveles de cuantificación de los cuatro patógenos en muestras de alimentos de contaminación natural. Pág. 112

Tabla 29. Valores de C_T obtenidos para las distintas concentraciones de DNA y células de *S. enterica* subsp. *enterica* CECT 915^T ensayadas en modo TaqMan y SYBR Green. Pág. 116

Tabla 30. Detección de *Salmonella* spp. en muestras naturales analizadas mediante RTi-PCR en modo TaqMan con los cebadores P1/P3 y la sonda OriP y los JHOL/R. Pág. 118

Tabla 31. Valores de C_T obtenidos mediante RTi-PCR simple (S) y múltiple (M), para distintas concentraciones de patógenos. Pág. 121

Tabla 32. Co-amplificación de *S. enterica* subsp. *enterica* CECT 915T *Sta. aureus* CECT 86^T, y *E. coli* O157:H7 CECT 4267 presentes en diferentes niveles a partir de DNA purificado y muestras vegetales inoculadas. Pág. 126-127

Tabla 33. Detección de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus* por RTi-PCR múltiple en vegetales inoculados, tras 6 h de enriquecimiento en APT. Pág. 128

Índice de Figuras

Figura 1. Evolución del número de casos de toxiinfecciones registrados en la Unión Europea desde 2002 a 2006 para *E. coli* verotoxigénica (—♦—), *L. monocytogenes*, (—†—), *Salmonella* spp. (—○—), *Sta. aureus* (—¶—). Pág. 9

Figura 2. Esquema de funcionamiento de las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan durante la reacción de PCR. F, Fluorocromo, Q, Quencher o silenciador. Pág. 28

Figura 3. Esquema de funcionamiento de las sondas de hibridación durante la reacción de PCR. A) Molecular Beacons y B) HybProbe. D, Donador, A, Aceptor o “Quencher”. Pág. 29

Figura 4. A) Ejemplo de curva de amplificación obtenida para distintas concentraciones de DNA. B) Recta patrón resultado de representar el valor de C_T frente al logaritmo de la concentración de DNA correspondiente. Pág. 30

Figura 5. Esquema del procedimiento de análisis de las muestras de alimentos de contaminación natural en el Lab1 y el Lab2. Pág. 62

Figura 6. Esquema de los pasos de enriquecimiento realizados para cada patógeno. Pág. 64

Figura 7. Productos de PCR correspondientes a las distintas concentraciones de *Salmonella* (en ufc/g), inoculada en brócoli, tras la extracción con DNeasy Tissue Kit. Pág. 85

Figura 8. Análisis de disociación de los amplicones generados por RTi-PCR en modo SYBR Green, con los cebadores uidAF/uidAR correspondiente a *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. Pág. 92

Figura 9. Análisis de disociación de los amplicones generados por RTi-PCR en modo SYBR Green correspondiente a *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 con los cebadores ttr4/ttr6. Pág. 95

Figura 10. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón a partir de DNA purificado (—) y suspensiones celulares calibradas (•••). Pág. 102

Figura 11. Análisis de las curvas de disociación de los amplificados obtenidos para las 22 cepas de referencia de *Salmonella* spp. Pág. 115

Figura 12. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón a partir de DNA purificado (—) y suspensiones celulares calibradas (•••). Pág. 117

Figura 13. Curvas de disociación correspondientes a la reacción RTi-PCR múltiple con SYBR Green en presencia de 1 ng de DNA de A) *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, B) *Sta. aureus* y *Salmonella*, C) *Sta. aureus* y *E. coli* O157:H7 y D) *Sta. aureus*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. Pág. 119

Abreviaturas

AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria
APPCC	Análisis de Puntos Críticos de Control
APT	Agua de Peptona Tamponada
CCA	Comisión del “ <i>Codex Alimentarius</i> ”
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CEN	Comité Europeo de Estandarización
C_T	Threshold Cycle (Ciclo umbral)
dATP	Desoxi-adenina-trifosfato
dCTP	Desoxi-citosina-trifosfato
dGTP	Desoxi-guanina-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
dUTP	Desoxi-uracilo-trifosfato
EAC	External Amplification Control (Control Externo de Amplificación)
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetraacético
EFSA	European Food Safety Authority (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria)
EN	Norma Europea
EMA	Etidio Monoácido
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay (Ensayo de Fluorescencia Asociada a un Enzima)
<i>et al.</i>	y colaboradores (<i>et alii</i>)
fg	Fentogramo
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia)
g	Gramo
IAC	Internal Amplification Control (Control Interno de Amplificación)
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización)
M	Molar
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MPN	Número Más Probable
MRS	Agar Man-Rogosa-Sharpe
NA	Agar Nutritivo



NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	picogramo
pH	Inversa del logaritmo de la concentración de H ⁺
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RTi-PCR	PCR a tiempo real
subsp.	Subespecie
T	Temperatura
TAE	Tris-acetato (40 mM); EDTA (1 mM)
TE	Tris-HCl (10 mM); EDTA (1 mM)
TSA	Agar Triptona Soja
TSB	Caldo Triptona Soja
U	Unidades
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Luz Ultravioleta
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
VIDAS	Vitek Inmuno Diagnostic Assay System
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

RESUMEN

La detección y cuantificación de microorganismos patógenos en alimentos es uno de los grandes retos a los que se enfrenta la industria alimentaria actualmente. Para ello, la aplicación de controles microbiológicos a lo largo de toda la cadena de procesado es imprescindible para minimizar riesgos y garantizar la calidad y seguridad de los productos. Los métodos tradicionales para la detección de patógenos en alimentos se basan en el aislamiento e identificación de colonias en medios selectivos tras uno o varios pasos de enriquecimiento lo que alarga el proceso y, en ocasiones, el resultado no es concluyente. Como alternativa destacan los métodos inmunológicos y los de PCR. Entre los primeros, el VIDAS® es uno de los más utilizados por las empresas de alimentos por su facilidad de ensayo. Por otra parte, las técnicas de PCR, constituyen una buena alternativa por su rapidez, sensibilidad y precisión. La PCR a tiempo real (RTi-PCR), además, ofrece la posibilidad de cuantificar los microorganismos presentes en la muestra automatizando el proceso, lo que permite procesar un número elevado de muestras, reduciendo los problemas de contaminaciones posteriores.

En este trabajo se ha aplicado la RTi-PCR, para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus*, evaluándose asimismo su utilidad como prueba diagnóstica en el control microbiológico de alimentos. La comparación de cuatro métodos comerciales de extracción de DNA, realizada en base a la sensibilidad en la detección por PCR, demostró que el método DNeasy Tissue Kit es el más eficiente para la extracción de DNA de los cuatro patógenos, en las tres matrices vegetales ensayadas. La aplicación directa de la RTi-PCR en muestras de alimentos de contaminación natural permitió la cuantificación de los patógenos presentes en el 67 % de las muestras que habían resultado positivas por PCR convencional tras el enriquecimiento correspondiente, revelando que *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 se encuentran generalmente en niveles de 10^3 ufc/g, *L. monocytogenes* de 10^2 ufc/g y *Sta. aureus*

de 10 ufc/g. Las muestras restantes (33%) presentaron niveles inferiores a 10 ufc/g. La comparación de la RTi-PCR directa y el procedimiento mini-VIDAS para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* determinó que ambas técnicas presentan una especificidad similar pero la RTi-PCR se comporta mejor en cuanto a “sensibilidad” y “seguridad” aún asumiendo que su aplicación directa, sin enriquecimiento, estará ofreciendo un resultado sesgado con posibles “falsos negativos”. En base a estos resultados, se propone la utilización de la RTi-PCR como técnica para rastrear la presencia de patógenos en el análisis rutinario de alimentos ya que ha demostrado ser una técnica rápida y sensible que permite completar el análisis en unas 5-6 horas, en lugar de las 24-72 horas que requiere el mini-VIDAS. Sólo las muestras negativas se analizarían por PCR, tras enriquecimiento, para asegurar la ausencia del patógeno.

Además, se diseñó un nuevo sistema de cebadores y sonda TaqMan para *Salmonella* spp. comprobándose su especificidad y sensibilidad en la detección en alimentos por RTi-PCR. Combinando este sistema con los ensayos para *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus*, se ha puesto a punto una reacción de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea y cuantitativa de los tres patógenos. La aplicación de la RTi-PCR múltiple, tras un paso enriquecimiento de tan sólo 6 horas permite la detección de hasta 1 célula de cada uno de los patógenos en 25 g. Por lo tanto, queda demostrada su validez como técnica analítica cuando la legislación exige “ausencia” del patógeno en 25 g, como es el caso de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 o de *Sta. aureus* en algunos alimentos.

I. INTRODUCCIÓN

1. Patógenos en alimentos: importancia en la salud pública

Las infecciones e intoxicaciones asociadas al consumo de alimentos suponen una preocupación creciente a nivel mundial y, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como las Agencias Europea y Española de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority EFSA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN) informan cada año sobre los agentes causantes de las principales toxiinfecciones de origen alimentario. Los datos aportados por estas agencias, sugieren que en los últimos años se ha producido un ligero incremento en los casos de toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos. Según la OMS, (WHO, 1999 y 2002) uno de los principales motivos de este incremento es el aumento de las resistencias y la adquisición de nuevos factores de virulencia por parte de microorganismos que resultaban inocuos. Por otro lado, las mejoras en las técnicas analíticas permiten detectar nuevos patógenos previamente no considerados, lo que contribuye al aumento en la incidencia de toxiinfecciones asociadas a alimentos. Además, el cambio de hábitos producido en la sociedad actual que incluye comer de forma regular fuera de casa o la creciente demanda de comidas preparadas y alimentos mínimamente procesados, ha repercutido de forma notable en el aumento del número de brotes de toxiinfecciones alimentarias.

1.1 Contaminación primaria y sus causas

La mayoría de los patógenos asociados a toxiinfecciones alimentarias son zoonóticos (de origen animal) y sus portadores son habitualmente animales sanos desde los cuales se transmiten a una gran variedad de

alimentos como es el caso de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* o *Campylobacter jejuni*. Otros patógenos como *Listeria monocytogenes* se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente o forman parte de la microbiota habitual del hombre como *Staphylococcus aureus*. En estos casos, la contaminación de los alimentos se produce durante su procesado como resultado de defectos en las prácticas higiénicas.

Los animales de granja habitualmente resultan contaminados debido a la transmisión horizontal desde el ambiente en el que se encuentran sobretodo a través de otros animales contaminados, el agua o animales salvajes como pájaros o roedores. Esta transmisión horizontal se ve favorecida por las condiciones de hacinamiento a las que se ven sometidos los animales en muchas granjas (Berndtson *et al.*, 1996, Davies y Breslin, 2001). Tras su paso por la cadena de producción, los productos derivados de estos animales llegan al consumidor.

Generalmente, las toxiinfecciones alimentarias se asocian a alimentos de origen animal o derivados como productos cárnicos, huevos, productos lácteos, etc. Sin embargo, la creciente demanda de productos más saludables por parte del consumidor, ha llevado, en los últimos años, al aumento en el consumo de ensaladas preparadas, frutas y verduras (Anon, 2007a). A pesar de que el número de brotes asociados a estos productos es menor que los asociados a alimentos de origen animal, en los últimos años han aumentado de forma considerable (Doyle y Erickson, 2008). Este aumento se debe principalmente a las nuevas prácticas agrícolas que permiten disponer de todo tipo de productos vegetales a lo largo del año, y al riego masivo con aguas reutilizadas o procedentes de depuradoras que, en ocasiones, presentan niveles de

contaminación fecal por encima de lo permitido causando la contaminación de los cultivos. Todos estos productos se consumen habitualmente crudos y con poco o ningún procesado previo y muchos de ellos llegan al mercado lavados, cortados y listos para el consumo. Durante el cultivo, la recogida, el transporte y el procesado posterior, pueden ser contaminados con patógenos de origen tanto animal como humano. Por todo ello, la contaminación de ensaladas, frutas y verduras durante su producción y procesado, puede desencadenar la aparición de grandes brotes extendiéndose a lo largo de amplias áreas geográficas (Everis, 2004, Sivapalasingam *et al.*, 2004). Además, se prevé que estos brotes sean cada vez más comunes debido al aumento en la distribución global de los alimentos (Little y Gillespie, 2008).

Los trastornos causados por los patógenos asociados a alimentos son principalmente de dos tipos:

i) Infección, se produce cuando el propio microorganismo viable penetra en el organismo donde su crecimiento y los productos de su metabolismo son los causantes de la enfermedad. Ejemplos de patógenos que producen infecciones son *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.

ii) Intoxicación, se produce cuando la presencia del microorganismo durante el almacenamiento de los alimentos genera la acumulación de una o varias toxinas que serán las causantes de la intoxicación. Por ejemplo, *E. coli* O157:H7, *Shigella* o *Sta. aureus*.

La EFSA recoge cada año, en un informe global, el número de brotes de toxiinfecciones alimentarias así como el número de personas afectadas por estos brotes. Este sistema comunitario para monitorizar y recoger

información sobre zoonosis, se basa en la directiva de 2003/99/EC1 (Anon., 2003), que obliga a los estados miembros de la Unión Europea a recoger los datos de todos los brotes de zoonosis registrados. El último informe disponible, contiene los datos correspondientes a 2006. En ese año, se registraron de forma generalizada los datos referentes a 8 agentes zoonóticos: *Salmonella*, *Campylobacter* resistentes al calor, *L. monocytogenes*, *E. coli* verotoxigénica, *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Trichinella* y *Echinococcus*. Además, en función de la situación epidemiológica de cada país, se registraron también los datos referentes a *Yersinia*, *Toxoplasma*, *Cysticerci*, *Sarcocystis*, fiebre Q, y otros contaminantes de origen microbiológico como histamina, toxinas estafilocócicas y *Enterobacter sakazakii*.

Así mismo, se informó de 5.705 brotes que afectaron a un total de 53.546 personas de las cuales 5.523 (10,3 %) fueron hospitalizadas y 50 resultaron muertas. En la Tabla 1 se detallan el número de brotes y afectados en función del agente causante de los mismos. De ellos, *Salmonella* es el patógeno que con mayor frecuencia se registra en la Unión Europea aunque se ha observado un ligero descenso en los últimos años. La campilobacteriosis es la segunda zoonosis más común causante de 1.304 casos. *Sta. aureus* fue el agente causal del 4,1 % de los brotes (236) y afectó a 2.057 personas causando dos muertes. En cuanto a *E. coli* verotoxigénica (patógena), fue la responsable del 0,8 % de los brotes y, aunque es uno de los patógenos más peligrosos, sólo causó una muerte. El número de brotes de listeriosis registrados fue relativamente bajo (9), pero se trata de una de las toxiinfecciones más letales ya que el 14 % de los afectados murieron.

En cuanto al tipo de alimento origen de estas toxiinfecciones, los más comunes son los huevos y sus derivados, responsables del 17,8 % de los brotes. La carne y sus derivados, así como el pescado y sus derivados, fueron los causantes del 10,3 y 4,6 % de los brotes, respectivamente.

Tabla 1. Agentes causantes de los brotes de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea en 2006.

Agente causante	Brotes				Casos en humanos		
	Nº	% del total	General	Hogar	Nº	Ingresos hospitalarios	Muertes
<i>Salmonella</i>	3.131	53,9	1.520	1.611	22.705	3.185	23
Desconocido	952	16,4	610	342	9.437	947	2
<i>Virus</i>	587	10,2	373	214	13.345	553	3
<i>Campylobacter</i>	400	6,9	116	284	1.304	65	0
<i>Staphylococcus</i>	236	4,1	157	79	2.057	277	2
Toxinas	86	1,5	20	66	834	261	3
<i>Clostridium</i>	81	1,4	55	26	1.651	44	2
<i>Bacillus</i>	78	1,3	66	12	964	34	0
<i>Histamina</i>	71	1,2	62	9	370	41	0
<i>E. coli patógena</i>	48	0,8	25	23	750	103	1
<i>Shigella</i>	33	0,6	19	14	138	22	0
<i>Yersinia</i>	26	0,4	11	15	604	15	2
<i>Giardia</i>	18	0,3	13	5	44	-	0
<i>Trichinella</i>	18	0,3	5	13	202	113	0
<i>Listeria</i>	9	0,2	5	4	120	89	17
Otros	9	0,2	5	4	31	2	0
<i>Cryptosporidium</i>	7	0,1	4	3	59	0	0
<i>Brucella</i>	6	0,1	3	3	43	3	0
<i>Flavivirus</i>	6	0,1	2	4	26	25	0
<i>Klebsiella</i>	3	0,1	2	1	109	1	0
<i>Streptococcus</i>	2	<0,1	2	0	236	-	-
EU Total	5.705	98,2	3.000	2.706	53.546	5.523	50

Sombreados los patógenos objeto de esta tesis.

1.2 Estrategias de vigilancia y control

Para prevenir las intoxicaciones y/o infecciones causadas por patógenos asociados a alimentos es necesario controlar en qué punto de

la cadena de producción se produce la contaminación y el mecanismo por el que el patógeno puede transmitirse al hombre. En este aspecto la estrategia tradicional de análisis del producto final ha dado paso al desarrollo del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) adoptado por la Comisión del “Codex Alimentarius” (CCA). Este sistema permite identificar peligros específicos y describe medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos centrándose en la prevención. La Unión Europea establece los criterios microbiológicos para algunos de los patógenos más habituales en alimentos así como las indicaciones para poner en práctica estos criterios, dirigidas a la industria alimentaria (Anon., 2005).

Entre los patógenos que habitualmente se investigan en alimentos debido a su gran impacto en la salud pública están *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Sta. aureus* que serán objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. En la Figura 1 se muestra la evolución en el número total de casos asociados humanos causados por estos cuatro patógenos registrados en la Unión Europea en el periodo comprendido entre 2002 y 2006. En ella se aprecia el aumento constante de los casos asociados a *L. monocytogenes* aunque éste sigue siendo el patógeno con menor incidencia. También se observa un ligero descenso en el número de casos asociados a *Salmonella* y a *Sta. aureus*, debido a la mejora en las prácticas higiénicas incorporadas en los últimos años. Por otro lado, a pesar de que los casos de *E. coli* verotoxigénica se han visto incrementados en 2006, este aumento se debe a un brote puntual en la Republica Checa y, en general, la tendencia observada por la EFSA en los casos asociados a este patógeno es de un ligero incremento.

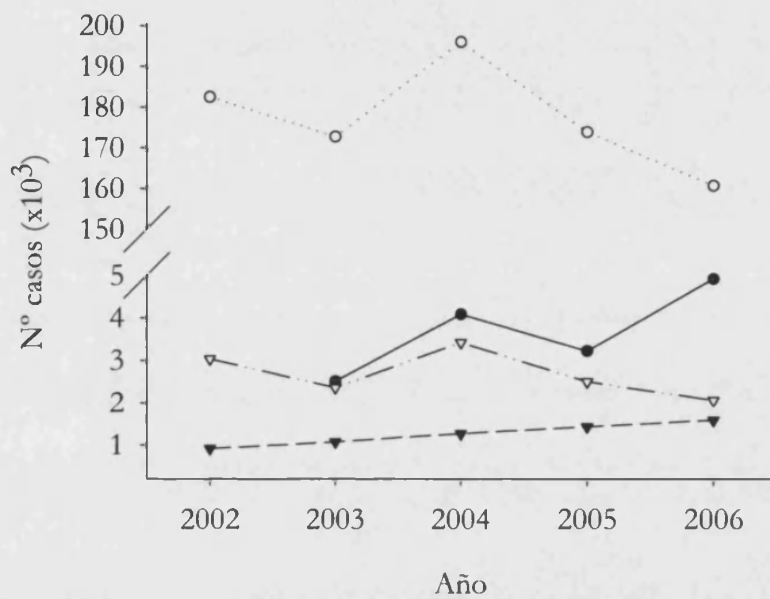


Figura 1. Evolución del número de casos de toxiinfecciones registrados en la Unión Europea desde 2002 a 2006 para *E. coli* verotoxigénica (—●—), *L. monocytogenes*, (---▼---), *Salmonella* spp. (.....○.....), *Sta. aureus* (---▽---).

1.3 *Escherichia coli* O157:H7

E. coli es una especie dentro de la familia de bacterias Gram negativas conocida como *Enterobacteriaceae*. Esta especie forma parte de la microbiota intestinal de los humanos y de los animales de sangre caliente por lo que normalmente es inofensiva. Sin embargo, desde principios del siglo XX se conoce la naturaleza patogénica de determinados serotipos y sus factores de virulencia se utilizan para la detección e identificación de estos serotipos. Por su localización intestinal, esta especie se encuentra en gran cantidad en las heces de muchos animales desde donde pueden contaminar tanto el suelo como el agua que son los principales vehículos de transmisión de la bacteria. Dentro de esta especie existen grupos de

cepas patógenas de las cuales la más toxigénica es el serovar O157:H7, que puede causar graves enfermedades alimentarias. *E. coli* O157:H7 fue identificada por primera vez como patógeno en 1982 (Riley *et al.*, 1983) y su patogenicidad se debe a varios factores:

- Capacidad de producir toxinas similares a las de *Shigella* (también conocidas como verotoxinas). En este aspecto, *E. coli* O157:H7 es capaz de sintetizar las toxinas *stx1* y *stx2*. Genéticamente, la secuencia de la primera es similar a la de *Shigella*, mientras que la *stx2* presenta una variabilidad muy amplia de secuencia entre ambos géneros así como aproximadamente un 56 % de similitud con la secuencia de la *stx1* (Melton-Celsa y O'Brien, 1998). Ambas toxinas se encuentran codificadas en un profago lambdaoide insertado en el genoma.

- Presencia de un plásmido de 60 MDa (pO157) que codifica para unas 35 proteínas entre las que se encuentra la hemolisina. Esta proteína, con la ayuda de sistemas de transporte especializados, es capaz de utilizar las células sanguíneas del hospedador como fuente de hierro (Law y Kelly, 1995).

La infección se transmite al hombre principalmente a través del consumo de alimentos contaminados como carne cruda o poco cocinada y leche. La contaminación fecal del agua y otros tipos de alimentos así como las contaminaciones cruzadas durante la manipulación, son también causas importantes de infección. Los principales síntomas que se presentan tras la infección son dolores abdominales y diarrea que puede progresar a diarrea hemorrágica. La recuperación suele llevarse a cabo en unos 10 días pero cuando afecta a ancianos o niños, puede

desencadenar el síndrome hemolítico urémico que se caracteriza por un fallo renal agudo y anemia hemolítica (Donnenberg *et al.*, 2000).

Aunque la incidencia de las intoxicaciones causadas por este microorganismo es baja, en los últimos años se ha visto ligeramente incrementada. Los últimos datos disponibles en la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aportados por los países de la Unión Europea correspondientes al año 2006, recogen un total de 4.916 casos de toxiinfecciones asociadas a *E. coli* O157:H7, de los cuales 13 se produjeron en España.

1.3.1 Otros serotipos

La mayoría de los brotes de intoxicaciones causadas por *E. coli* se asocian al serotipo O157, sin embargo, se ha descrito que las cepas causantes de gastroenteritis pueden pertenecer a más de 100 serotipos distintos (Posse *et al.*, 2008a). En el período comprendido entre 2002 y 2006, considerando los brotes en los cuales se estableció el serotipo causante, el 66 % se asociaron al O157, el 20% a los serotipos O26, O103, O91, O145 y O111 y el resto (14 %) a otros serotipos (Anon., 2007a). La incidencia de estos serotipos depende en gran medida de la zona geográfica. Así, en el Reino Unido, la mayoría de los casos (83 %) se deben al O157:H7 (Lynn *et al.*, 2005) mientras que en Alemania y Austria, este serotipo se asocia al 57 % de los brotes (Gerber *et al.*, 2002). En la mayoría de los países, no existen métodos normalizados para la detección de estos serotipos y al tratarse de cepas que fermentan el sorbitol, no se recuperan del medio SMAC utilizado para el serotipo O157:H7. Recientemente, se han desarrollado y evaluado medios de

cultivo específicos que permiten el aislamiento e identificación de estos serotipos (Possé *et al.*, 2008 a y b) lo que facilitará su inclusión en los criterios microbiológicos para los alimentos. Sin embargo, existen evidencias de que la capacidad toxigénica es dependiente de cepa y en muchos de estos serogrupos O, coexisten cepas toxigénicas y no toxigénicas lo que dificulta aún más su identificación (Perelle *et al.*, 2007). Por todo ello, la EFSA recomienda la utilización de métodos de detección molecular dirigidos a genes específicos de las verocitotoxinas y de los serotipos, combinados con el aislamiento de las cepas para su caracterización (Anon., 2007a).

1.4 *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* está compuesto por seis especies actualmente reconocidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayii*. (Euzéby, 2008, <http://www.bacterio.cict.fr/>). De entre todas ellas, solo dos especies se consideran patógenas, *L. monocytogenes* en humanos y *L. ivanovii* en otros mamíferos. *L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa y que puede crecer entre 4 y 50 °C (Farber y Peterkin, 1991). Aunque existen 13 serovares de esta especie capaces de causar infecciones en humanos, (Farber y Peterkin, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Wiedmann, 2002), la mayoría de los brotes comunicados a las agencias oficiales se deben a los serovares 1/2a, 1/2b y 4b. Presenta gran capacidad de adaptación fisiológica a distintas condiciones por lo que *L. monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido aislada de una gran variedad de matrices incluyendo suelos, vegetación, materia fecal y aguas. Sin

embargo, los modelos descritos para este patógeno asumen que la principal vía de transmisión son los alimentos (Roucourt y Bille, 1997). Por ello, los métodos de manipulación, tratamiento y conservación de alimentos, pueden causar la selección de determinados serotipos mejor adaptados a esas condiciones (Tasara y Stephan, 2006). La contaminación de los alimentos se produce habitualmente durante su procesado sobretodo en alimentos de origen animal como leche cruda, carne y pescado. También se puede encontrar en alimentos precocinados e incluso en frutas y verduras frescas. Aunque normalmente *L. monocytogenes* se encuentra en muy bajo número en estos alimentos, su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración permite que se multiplique durante el almacenamiento.

La ingestión de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* puede causar listeriosis, sobretodo en grupos de riesgo dentro de la población, al penetrar el microorganismo en el tracto intestinal estableciendo infecciones en zonas normalmente estériles del organismo. Desde allí es transportada por el propio sistema inmune del hospedador hasta otras zonas del cuerpo lo que desencadena fiebre, dolores musculares y en ocasiones, náuseas ó diarrea. En recién nacidos y adultos con el sistema inmune debilitado, la infección puede diseminarse al sistema nervioso o a la circulación sanguínea y causar fiebre repentina, dolor de cabeza intenso, rigidez del cuello, confusión, meningitis y/o encefalitis. En mujeres embarazadas, causa infecciones con síntomas similares a la gripe que afectan al feto produciendo abortos. Aunque, se trata de una enfermedad relativamente rara, la gravedad de esta infección

hace necesario el control exhaustivo de este microorganismo (Kathariou, 2000).

1.5 *Salmonella* spp.

Dentro de las Enterobacterias, el genero *Salmonella* comprende actualmente 2.463 serotipos de bacilos Gram negativos. La clasificación taxonómica de este género ha evolucionado a lo largo de los años. En primer lugar, basándose en el concepto “un serotipo-una especie” propuesto por Kauffmann (1966), cada serotipo de *Salmonella* descrito era considerado una especie independiente. Posteriormente, la demostración, mediante hibridación DNA-DNA, de que todos los serotipos estaban relacionados genéticamente a nivel de especie (Crosa *et al.*, 1973), supuso el inicio del desarrollo de la nomenclatura del género. La única excepción descrita fue *Salmonella bongori* que demostró ser una especie independiente (Reeves *et al.*, 1989). A partir de estos datos Le Minor *et al.* (1982a y b) propusieron el nombre de *Salmonella cholerasuis* como nombre de la especie y establecieron 7 subespecies (*arizonae*, *diarizonae*, *bongori*, *cholerasuis*, *houtenae*, *indica* y *salamae*). Posteriormente, se determinó que esta nomenclatura resultaba confusa debido a que el nombre “*cholerasuis*” se refiere tanto a una especie como a un serotipo. Debido a esto, en 1987 Le Minor y Popoff, propusieron como nombre de la especie *Salmonella enterica* y describieron siete subespecies denominadas *arizonae*, *diarizonae*, *bongori*, *enterica*, *houtenae*, *indica* y *salamae*. Más tarde se propuso mantener esta nomenclatura pero considerando *S. enterica* subsp. *bongori* como una especie independiente denominándola *S. bongori* debido a sus diferencias genéticas con el resto de cepas. En la

Tabla 2 se muestran las especies y subespecies de *Salmonella* así como el número de serotipos que se han descrito hasta el momento para cada una de ellas (Brenner *et al.*, 2000).

Tabla 2. Especies, subespecies y serotipos de *Salmonella* y sus hábitats más frecuentes.

Especies y subespecies	Nº serotipos	Hábitat
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1.454	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	489	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	94	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	324	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	70	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	12	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i>	20	Animales de sangre fría y ambiente
Total	2.463	

Esta clasificación taxonómica del género no ha sido oficialmente aceptada por la Comisión Judicial del Comité Internacional de Sistemática de Procariontes pero está siendo utilizada de manera generalizada en los estudios publicados en los últimos años.

La infección por *Salmonella* produce una gran variedad de enfermedades conocidas como salmonelosis. En este aspecto, es uno de los patógenos con mayor impacto en la salud pública y sus consecuencias representan un coste significativo para muchos países. La patogenicidad de las bacterias de este género, varía en función del serovar, la cepa, la dosis infectiva, la naturaleza del alimento contaminado y sobretodo del estado del organismo hospedador. La salmonelosis en humanos se contrae generalmente debido al consumo de alimentos de origen animal



aunque también puede estar presente en otros alimentos como frutas y verduras debido al riego con aguas contaminadas. Los principales síntomas de esta enfermedad son fiebres altas, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos. En los casos en los que afecta a ancianos o a niños, la deshidratación asociada, puede causar problemas graves e incluso la muerte. Aunque la salmonelosis es de fácil tratamiento mediante el uso de antibióticos, se ha observado un incremento en las cepas que presentan resistencias a los antibióticos, lo que dificulta su tratamiento (García del Portillo, 2000).

1.6 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa con requerimientos nutricionales moderados. Las células son esféricas y se unen formando parejas o grupos similares a racimos de uva. Crece en un amplio rango de temperaturas que va desde 7 a 48 °C, y son tolerantes a altas concentraciones de NaCl (hasta el 20 %). La mayoría de las cepas de *Sta. aureus* producen enterotoxinas termoestables. La intoxicación asociada a este patógeno resulta de la ingestión de estas enterotoxinas que se forman y acumulan en los alimentos.

Los alimentos más frecuentemente asociados a intoxicaciones estafilocócicas son carnes, ensaladas, productos de pastelería y, en general, cualquier producto que sufra un proceso de manipulación ya que gran parte de la población es portadora asintomática de esta bacteria. La intoxicación estafilocócica genera un cuadro de vómitos y diarrea que se desarrolla entre 30 min y 8 h después del consumo del alimento contaminado. No se trata de una intoxicación letal y suele remitir en unas

horas o días. Sin embargo, cuando afecta a grupos de riesgo como ancianos, niños o adultos inmuno-deprimidos, la sintomatología puede resultar más grave.

2. Detección de patógenos en alimentos

2.1 Métodos tradicionales

Los microorganismos patógenos se encuentran en los alimentos habitualmente en bajo número y en condiciones no siempre favorables, debido a su carácter alóctono en los mismos y a los tratamientos de conservación a que han sido sometidos. Tradicionalmente, su detección se lleva a cabo mediante métodos basados en el cultivo que requieren de la utilización de varios pasos de enriquecimiento, seguidos del aislamiento en medios sólidos selectivos específicos de cada patógeno, con tiempos que oscilan entre 24-48 h en cada paso. Además, una vez aislado el patógeno, ha de confirmarse su identidad mediante pruebas bioquímicas lo cual alarga el análisis 24-48 h más y, en muchas ocasiones, la identificación queda como incierta, resultando el análisis no concluyente. Las normas europeas (EN) e internacionales (ISO) describen los métodos de detección y aislamiento para cada uno de los patógenos, además de determinar los límites máximos permitidos en los distintos tipos de alimentos. En la Tabla 3 se muestran dichos límites para los patógenos en estudio según el tipo de alimento así como la norma EN/ISO que los regula (Anon, 2007b).

Tabla 3. Límites permitidos para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *Sta. aureus* en distintos tipos de alimentos y método analítico de referencia según las normas EN/ISO.

Patógeno	Categoría alimento	Límites	Fase de análisis	Método analítico de referencia ^a
<i>E. coli</i> O157:H7		Sin determinar		EN/ISO 16654:2001
<i>L. monocytogenes</i>	Alimentos listos para el consumo. Carnes de consumo crudo. Especies y condimentos. Frutas y hortalizas troceadas, zumos no pasterizados. Pescados ahumados. Todos ellos que pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g	Tras la producción	EN/ISO 11290-1
		100 ufc/g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 11290-2
	Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	100 ufc/g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 11290-2
<i>Salmonella</i>	Carnes para consumo crudo o cocinado Gelatina, colágeno, quesos, mantequillas Cremas, leche en polvo y sueros Helados, huevos y derivados Alimentos precocinados con huevo crudo Moluscos, crustáceos, bivalvos crudos Frutas y verduras precortadas, zumos no pasterizados Condimentos y especias	Ausencia en 25 g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6579
	Carne picada y/o separada mecánicamente	Ausencia en 10 g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6579
<i>Sta. aureus</i>	Queso fresco, leche en polvo y derivados Mariscos con concha, carne picada Frutas, verduras y hortalizas congeladas	100 ufc/g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6888-3:2003/ AC:2005
	Leche cruda para consumo directo y derivados	100 ufc/ml	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6888-3:2003
	Leche cruda que se procesará	2000 ufc/ml	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6888-3:2003
	Quesos hechos a partir de leche cruda	10000 ufc/g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6888-3:2003
	Semiconservas	Ausencia/g	Vida útil en el mercado	EN/ISO 6888-3:2003

^aVer Anexo I

Se describe a continuación brevemente el proceso de enriquecimiento y detección recogido en el método analítico de referencia (EN/ISO) para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *Sta. aureus*:

2.1.1 *E. coli* O157:H7

Para la detección de *E. coli* O157:H7 según la norma EN/ISO 16654:2001, se realiza un enriquecimiento selectivo en caldo triptona soja suplementado con novobiocina a 41,5 °C durante 6 h. Se siembra en medio agar TC-SMAC selectivo para este serotipo (Agar MacConkey con Sorbitol, Telurito potásico y Cefixima). Las placas se incuban a 37 °C durante 18-24 h. Se seleccionan las colonias rojas (que no fermentan el sorbitol) y se confirman serológicamente.

2.1.2 *L. monocytogenes*

Para la detección de *L. monocytogenes* siguiendo las indicaciones de la norma EN/ISO 11290, se realiza un preenriquecimiento selectivo en medio Fraser semi-concentrado y se incuba a 30 °C durante 48 h, y un enriquecimiento en medio Fraser completo a 37 °C durante 24 h. A continuación se realiza el aislamiento en medio Aloa (Ottaviani *et al.*, 1997) incorporado recientemente (ISO 11290-1:1996/AM1:2004, Anexo I) para mejorar el aislamiento selectivo diferencial de *L. monocytogenes* con respecto a los medios Palcam y Oxford recomendados en la primera norma aprobada. En agar Aloa la identificación se basa en la actividad β -glucosidasa que atrapa al cromógeno que aporta a la colonia un color azul verdoso. Estudios recientes han concluido que este medio mejora

notablemente la sensibilidad para la detección de *L. monocytogenes* (Vlaemynck *et al.*, 2000, Sacchetti *et al.*, 2003, Greenwood *et al.*, 2005). Las colonias típicas se seleccionan para confirmar su identificación mediante las tiras API-Listeria. Este proceso requiere de al menos 7 días. Existen, además, otros medios cromogénicos como el RAPID L. mono que se basa en la actividad PI-PLC que genera colonias azuladas para *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Estas dos especies se diferencian posteriormente por la capacidad de fermentar la xilosa que presenta *L. ivanovii*. Aunque se ha recomendado la sustitución de los tradicionales Palcam y Oxford por estos nuevos medios cromogénicos, y se han incluido modificaciones en la norma ISO correspondiente, estudios recientes indican que la sensibilidad de estos medios está muy condicionada por el tipo de muestra de partida por lo que será necesario escoger el medio más adecuado en cada caso (Becker *et al.*, 2006).

2.1.3 *Salmonella* spp.

Su detección por métodos de cultivo se describe en la norma EN/ISO 6579:2002. Consiste en un preenriquecimiento no selectivo en Agua de Peptona Tamponada (APT), durante 20 horas, a 37 °C. A continuación se realiza un enriquecimiento selectivo, en paralelo, en dos medios de cultivo (Rappaport-Vasiliadis y Muller-Kauffmann tetracionato) durante 24 horas a 37 °C. Finalmente, se siembra en medio selectivo y diferencial XLD (agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato). Existen medios cromogénicos como el agar Miller-Mallison (MM) (Miller y Mallinson, 2000), el agar AES Salmonella y el agar cromogénico de Oxoid que han demostrado tener una sensibilidad variable y que

requieren de un mayor estudio para su posible inclusión en futuras normas ISO (Schönenbrücher *et al.*, 2008).

2.1.4 *Sta. aureus*

La detección y cuantificación de *Sta. aureus* queda recogida en los métodos descritos en la norma EN/ISO 6888:1999 Parte 1 y Parte 2. Tras la homogenización del alimento en agua de peptona tamponada (APT), se siembran diluciones decimales seriadas de la mezcla en medio Baird-Parker (parte 1) o en agar con Fibrinógeno de Plasma de Conejo (parte 2). Tras incubar las placas a 37 °C durante 48 h se realizan recuentos de las colonias coagulasa positivas en el agar Baird-Parker y calcula el número de unidades formadoras de colonia (ufc) por g de alimento. Posteriormente, en la norma ISO 6888-3:2003, se incluyó el protocolo para la detección de concentraciones bajas de *Sta. aureus* por el método del número más probable (MPN). En este caso, se incluye un paso de enriquecimiento en medio Giolitti-Cantoni en el que el crecimiento de los estafilococos se ve favorecido por la presencia de piruvato y glicina causando un ennegrecimiento del medio debido a la reducción del telurito a telurio. Tras el enriquecimiento, se siembran placas en agar Baird Parker a partir de los tubos positivos, para su confirmación.

Para todos los patógenos, tras el aislamiento de las colonias sospechosas, éstas se someten a pruebas bioquímicas y serológicas para confirmar su identidad con lo que el proceso global se alarga entre 5 y 7 días.

2.2 Técnicas moleculares como alternativa para la detección de patógenos en alimentos

Los métodos basados en el cultivo, se consideran el “gold standard” para la detección de patógenos en alimentos (Gracias y McKillip, 2004). Son sensibles, económicos y dan información cualitativa y cuantitativa de los microorganismos presentes en una muestra de alimento. Sin embargo, requieren de varios días para la obtención de resultados y, además, resultan muy laboriosos (de Boer y Beumer, 1999). En los últimos años, se han desarrollado y mejorado nuevos métodos para la detección de patógenos en alimentos utilizando, en ocasiones, los métodos convencionales como base. Muchos de estos métodos modernos combinan una fase de enriquecimiento con una fase automatizada o semi-automatizada para la detección, basada en anticuerpos o en la utilización de determinados sustratos (Bhunja, 2008). Todos ellos tienen en común la utilización de biosensores que detectan la formación de complejos ya sea antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato o receptor-ligando. Se trata de técnicas que se han desarrollado ampliamente en los últimos años (Anderson y Taitt, 2005; Rasooly y Herold, 2006; Geng y Bhunia, 2007) pero presentan como principal inconveniente las interferencias ocasionadas por los componentes de la matriz del alimento así como el hecho de que las poblaciones de patógenos se encuentran en una proporción muy baja respecto a la microbiota endógena del alimento. Entre estos métodos cabe destacar:

- Bioluminiscencia, basada en la utilización de la enzima luciferasa para medir la cantidad de ATP que está directamente relacionada con el número de células presentes. Aunque no resulta específico, este método es útil para valorar la carga microbiana presente.

· Recuento de células, ya sea por citometría de flujo, midiendo la dispersión de la luz causada por los microorganismos o mediante microscopia epifluorescente basada en la unión del fluorocromo naranja de acridina a los microorganismos. Al igual que la bioluminiscencia, este método no identifica específicamente al patógeno pero permite valorar el grado de contaminación de una muestra.

· Impedimetría, basada en los cambios de conductancia de un medio donde los microorganismos crecen y su metabolismo modifica las condiciones del medio.

· Métodos inmunológicos, basados en la unión específica de un anticuerpo a un antígeno. Uno de los más utilizados en las empresas de alimentos, por su facilidad de ensayo, es el método inmunológico VIDAS® (Vitek Inmuno Diagnostic Assay System, Biomerieux). Este método requiere en primer lugar, de un paso de enriquecimiento en el medio selectivo adecuado para cada patógeno, con una duración de entre 24 y 48 h. A partir del enriquecimiento, se lleva a cabo un ensayo inmunoenzimático en el que intervienen anticuerpos que reconocen al patógeno correspondiente. Dichos anticuerpos van unidos a un enzima con una molécula fluorescente que mediará la emisión de fluorescencia (Enzyme Linked Fluorescent Assay, ELFA). La medida de la fluorescencia mediante un biosensor o inmunoanalizador determinará la presencia del correspondiente patógeno. Actualmente existe en el mercado una gran variedad de sistemas VIDAS para la detección de patógenos asociados a alimentos como son: *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella*, *Yersinia* y las toxinas de *Sta. aureus*.

· Métodos basados en los ácidos nucleicos y en la hibridación específica de cebadores y/o sondas con determinadas secuencias del DNA o RNA. Dentro de estos métodos los más utilizados y desarrollados son los que utilizan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3. Técnicas de PCR

3.1 PCR convencional

El desarrollo e introducción de nuevas técnicas moleculares para la detección y cuantificación de microorganismos han desplazado en los últimos años a los métodos tradicionales basados en el cultivo. Entre estas técnicas, destaca la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) por su rapidez y la precisión en la detección de microorganismos (Hill, 1996). Se basa en la amplificación específica de fragmentos de ácidos nucleicos utilizando un par de oligonucleótidos sintéticos (cebadores) diseñados para hibridar en orientación 5’-3’ en cada una de las cadenas de DNA. Cada cebador determina el punto de inicio para la síntesis de una cadena complementaria de DNA añadiendo desoxinucleótidos gracias a la acción de una enzima DNA polimerasa termoestable. Durante el desarrollo de la reacción, este fragmento de DNA se multiplica de forma exponencial generando múltiples copias denominadas amplicones. El proceso consta de tres fases: i) desnaturalización del DNA a temperaturas por encima de 90 °C, ii) unión de los cebadores al DNA molde a la temperatura óptima para ello (normalmente entre 50 °C y 60 °C) y iii) extensión de la cadena mediante la actuación de la DNA polimerasa (Park *et al.*, 1993). La visualización

del resultado se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa, en presencia de bromuro de etidio y durante la irradiación con luz ultravioleta (Kidd *et al.*, 2000).

3.2 RTi-PCR

Los avances tecnológicos de la última década han llevado al desarrollo de equipos de PCR a tiempo real (RTi-PCR) que permiten la detección cuantitativa y automatizada de la diana elegida. El fundamento de esta técnica es la detección de una señal fluorescente emitida durante la amplificación, con lo que se dispone del resultado en tiempo real. La detección automatizada de la señal fluorescente evita la electroforesis posterior y los tubos de PCR se desechan sin abrir con lo que se reduce notablemente el riesgo de contaminaciones así como el tiempo de análisis.

La fluorescencia se puede obtener de dos formas: i) utilizando fluorocromos que interaccionan de forma inespecífica con el DNA de doble cadena y ii) utilizando sondas de secuencia específica marcadas con fluorocromos.

3.2.1 Sistemas inespecíficos

Son fluorocromos no específicos que se unen al surco menor de la doble cadena del DNA. Cuando se encuentran libres en solución emiten poca fluorescencia sin embargo, cuando se unen al DNA modifican su conformación y emiten fluorescencia al ser iluminados con una longitud de onda determinada. Se han descrito numerosos fluorocromos que presentan estas propiedades como son: Bromuro de

Etidio (Higuchi *et al* 1992), YO-PRO (Tseng *et al.*, 1997), BEBO (Bengtsson *et al.*, 2003), BOXTO (Lind *et al.*, 2006), LCGreen (Herrman *et al.*, 2006), SYTO9 (Monis *et al.*, 2005). Los más utilizados son el SYBR Green I (Wittwer *et al.*, 1997) y el SYBR Gold (Tuma *et al.*, 1999) ya que la óptica de la mayoría de los instrumentos de RTi-PCR es adecuada para detectar a la longitud de onda de emisión del SYBR (520 nm). Además, al ser uno de los más utilizados, las casas comerciales lo suministran en cantidades optimizadas simplificando el proceso de puesta a punto.

El uso de estos fluorocromos presenta como principal desventaja que pueden emitir fluorescencia de forma inespecífica, ya sea al unirse a los dímeros, que pueden formar los cebadores (primer-dimer), o a amplicones inespecíficos generados a lo largo de la reacción. Para determinar el origen de la fluorescencia observada, se añade un último paso a la reacción en el que se realiza un barrido de temperaturas desde 60 a 95 °C. Durante este periodo, el amplicón se desnaturaliza dando un descenso en la fluorescencia. La curva de disociación se obtiene al hacer la derivada del valor de fluorescencia para cada temperatura. El punto más alto de esta curva nos indica la temperatura de fusión (T_m) del amplicón, temperatura a la que, al menos el 50 % de los amplicones se encuentran desnaturalizados. Esta T_m es específica del amplicón y viene determinada por el número de bases y el porcentaje en G+C, lo que permite diferenciarlo de productos de amplificación inespecíficos (Simpson *et al.*, 2000).

3.2.2 Sistemas específicos: Sondas marcadas

Otra forma de obtener la señal se basa en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Este método requiere de la presencia de dos fluorocromos. Al incidir la luz sobre uno de ellos (donador), éste se excita y emite en una longitud de onda mayor que coincide con la longitud de onda de excitación del segundo fluorocromo (silenciador o “quencher”). Mientras ambos fluorocromos se encuentran cercanos, el aceptor impide que se emita fluorescencia. Durante la amplificación de un fragmento específico se altera la posición relativa de dichas moléculas alejando el fluorocromo del silenciador por lo que se produce un incremento en la fluorescencia. En estos sistemas se distingue entre destructivos y no destructivos:

3.2.2.1 Sistema destructivo o de hidrólisis

Las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan son oligonucleótidos marcados con dos fluorocromos (donador y silenciador). En la reacción de PCR, durante el paso de hibridación, se unen al segmento de DNA situado entre los dos cebadores (Figura 2). El tamaño de la sonda favorece que el silenciador actúe sobre el aceptor impidiendo que se emita fluorescencia. A lo largo de la amplificación, la actividad 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa hidroliza la sonda separando el silenciador del fluorocromo y, como resultado, este último emite fluorescencia (Mackay, 2004). Dentro de este tipo de sondas, están las llamadas sondas MGB (“Minor Group Binding”) que llevan un oligopéptido MGB en el extremo 3' con gran afinidad por el surco menor del DNA de doble cadena, lo que estabiliza la unión entre la sonda y el DNA molde. Esta mayor estabilidad permite la detección de

dianas con un único desapareamiento en la secuencia (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) en PCR a tiempo real (Kutyavin *et al.*, 2000). Por otro lado, la molécula MGB al reforzar la unión aumenta la temperatura de hibridación de la sonda lo que permite el diseño de sondas más cortas. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluorocromo y en el 3' con un silenciador o quencher oscuro que no emite fluorescencia (“Dark quencher”) reduciendo el ruido de fondo y mejorando la eficiencia en la detección.

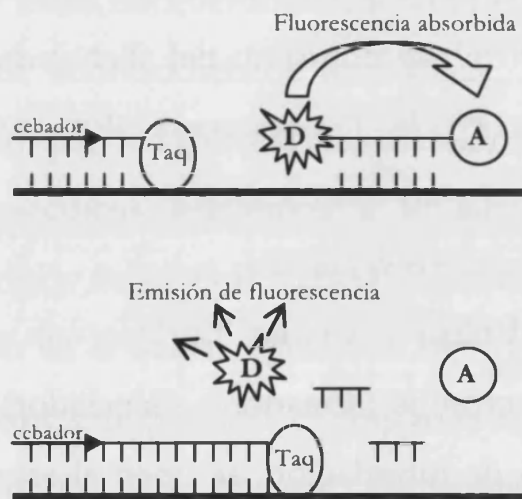


Figura 2. Esquema de funcionamiento de las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan durante la reacción de PCR. F, Fluorocromo, Q, Quencher o silenciador.

3.2.2.2 Sistemas no destructivos o de hibridación

En estos sistemas, las sondas no se destruyen a lo largo de la reacción por lo que pueden ser utilizadas para determinar la naturaleza del amplicón tras la reacción, generando curvas de disociación de modo similar al SYBR Green. Existen numerosos tipos de sondas de hibridación como son: sondas “Ying Yang”, sondas “Light Up”, sondas

“PNA”, etc. Pero las más utilizadas son las “Molecular Beacons” y las “Hyb-Probes”. Las primeras (Figura 3A) forman un lazo cuando se encuentran libres, de modo que el donador y el aceptor de fotones se encuentran cercanos y no se emite fluorescencia. Al hibridar con el DNA diana, ambas moléculas se separan y tiene lugar la emisión de fluorescencia. Las Hyb-Probes consisten en una pareja de oligonucleótidos marcados uno con el donador y otro con el aceptor. A diferencia de los casos anteriores, el donador no emite fotones de forma libre. Ambos oligonucleótidos hibridan en el amplicón, a no más de 5 nucleótidos de distancia, de forma que el donador cede protones al aceptor que en este caso es el que genera la fluorescencia (Figura 3B).

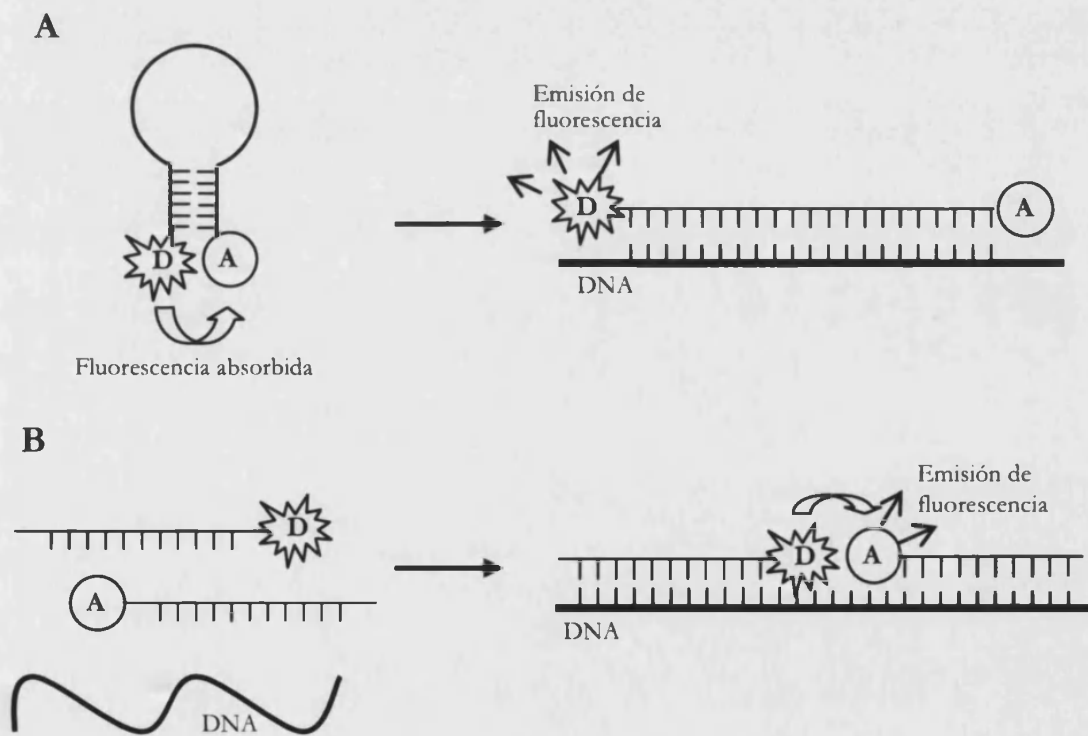


Figura 3. Esquema de funcionamiento de las sondas de hibridación durante la reacción de PCR. A) Molecular Beacons y B) HybProbe. D, Donador, A, Aceptor o “Quencher”.

En todos los casos, tanto utilizando sistemas específicos como inespecíficos, la cuantificación es posible ya que la variación en intensidad de la fluorescencia a lo largo de la reacción está directamente relacionada con la cantidad de DNA molde inicial. La monitorización de la reacción tiene lugar mediante lectura continua de la fluorescencia, emitida tras iluminación con luz ultravioleta, y permite determinar el ciclo en el cual se inicia la fase exponencial de la amplificación (ciclo umbral, C_T), parámetro que está directamente relacionado con la cantidad de DNA molde inicial y que se utiliza en la cuantificación (Figura 4A). Para la cuantificación es necesario construir previamente una recta patrón con concentraciones conocidas de DNA. La recta se obtiene al representar el valor de C_T , en función del logaritmo de la concentración (Figura 4A y B).

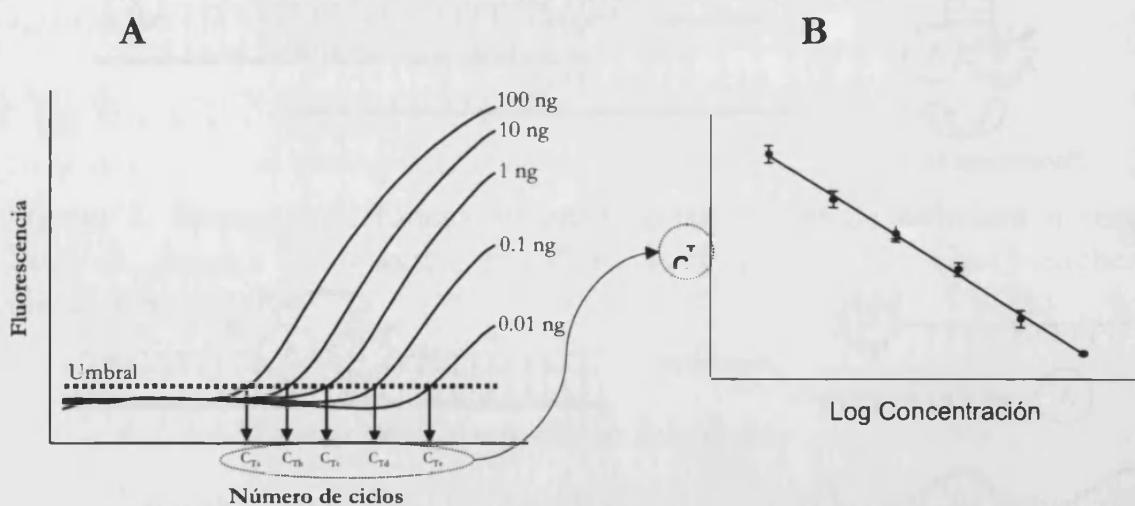


Figura 4. A) Ejemplo de curva de amplificación obtenida para distintas concentraciones de DNA. B) Recta patrón resultado de representar el valor de C_T frente al logaritmo de la concentración de DNA correspondiente.

3.3 PCR múltiple

Entre las ventajas de la PCR está la capacidad de amplificar más de un DNA molde simultáneamente lo que se conoce como PCR múltiple (Chamberlain *et al.*, 1988). Para ello intervienen varios pares de cebadores dirigidos a distintos genes dentro de un mismo genoma, o específicos de distintos microorganismos, combinados en un único ensayo de PCR. Gracias a esta característica, la PCR múltiple permite detectar más de un patógeno a partir de una misma muestra con lo que disminuye el volumen de reactivos empleados y, por tanto, los costes (Perry *et al.*, 2007). Esta aproximación ha sido utilizada en diversos campos de la microbiología para la diferenciación rápida de distintas especies y, concretamente en relación con los alimentos, existen trabajos en los que se aborda la detección simultánea de dos patógenos como *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Mukhopadhyay *et al.*, 2007), para tres *C. jejuni*, *Salmonella* spp., y *E. coli* O157:H7 (Gilbert *et al.*, 2003) e incluso cinco, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Sta. aureus*, *L. monocytogenes*, y *Vibrio parahaemolyticus* (Kim *et al.*, 2007) utilizando PCR convencional. En cuanto al desarrollo de reacciones de RTi-PCR múltiples, las publicaciones son escasas y se centran sobretudo en el análisis de muestras clínicas para la detección de patógenos asociados a la meningitis (Corless *et al.*, 2001), a la mastitis (Gillespie y Oliver, 2005) o a la neumonía (Welti *et al.*, 2003), así como a la detección de enterotoxinas y genotipado (Ibekwe *et al.*, 2002; Jothikumar y Griffiths, 2002; Grant *et al.*, 2006). En cuanto a patógenos asociados a alimentos, Sharma y Carlson (2000) describieron una PCR fluorogénica (utilizando sondas marcadas) para la detección simultánea de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7,

tras un paso de enriquecimiento, en carnes inoculadas artificialmente. Más recientemente, se han descrito reacciones de RTi-PCR múltiple con SYBR Green I para la detección simultánea de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, tras un paso de enriquecimiento, en muestras inoculadas de agua y leche (Jothikumar *et al.*, 2003) y en muestras de salchichas (Wang *et al.*, 2004).

En la PCR convencional, la diferenciación de los amplicones por electroforesis se realiza en función de su tamaño, por lo que es esencial que los distintos amplicones tengan tamaños lo suficientemente diferentes. En el caso de la RTi-PCR múltiple con fluorocromos inespecíficos del tipo SYBR Green, la discriminación entre los distintos amplicones se lleva a cabo mediante análisis de las curvas de disociación obtenidas tras la reacción. Para ello, es necesario que la T_m de cada amplicón difiera de las demás en al menos 1 °C (Ririe *et al.*, 1997; Lipsky *et al.*, 2001). Si se trata de una RTi-PCR múltiple de sistema específico, la discriminación de los amplicones está ligada al fluorocromo con el que están marcadas las sondas. El desarrollo de una RTi-PCR múltiple utilizando sondas marcadas, presenta la ventaja de una mayor especificidad pero está limitada por el número de fluorocromos existentes capaces de emitir a una longitud de onda lo suficientemente diferente como para evitar solapamiento de los espectros de emisión (Tabla 4). Esta limitación también viene determinada por las características del equipo utilizado.

Tabla 4. Longitud máxima de excitación y emisión para los fluorocromos habitualmente utilizados en RTi-PCR.

Fluorocromo	Máximo de excitación (nm)	Máximo de emisión (nm)
FAM	494	518
TET	521	538
JOE	520	548
VIC	538	552
Yakima Yellow	526	552
HEX	535	553
NED	546	575
Cy3	552	570
TAMRA	560	582
Cy3.5	588	604
ROX	587	607
Texas Red	596	615
Cy5	643	667

Los ensayos de RTi-PCR múltiple requieren de una optimización exhaustiva para garantizar el correcto funcionamiento tanto de los cebadores como de las sondas. A diferencia de las reacciones simples, donde sólo entran en juego un par de cebadores y una sonda, en la reacción múltiple la presencia de diversos cebadores y sondas favorece la formación de dímeros entre ellos, lo que reduciría la eficiencia de la reacción. Además, en el caso de utilizar fluoroforos no específicos del tipo del SYBR Green, estos se pueden unir a los dímeros formados por los cebadores produciendo fluorescencia inespecífica. Por todo esto, el diseño de los cebadores para las reacciones de PCR múltiple ha de ser muy preciso (Cirino *et al.*, 2004).

4. Aplicación de la PCR para la detección de patógenos en alimentos

Los métodos tradicionales para la detección de patógenos en alimentos basados en el cultivo, han sido los más utilizados desde que Robert Koch y posteriormente sus discípulos, comenzaron a utilizar medios de cultivo sólido para el aislamiento y la purificación de microorganismos (Stanier *et al.*, 1963). El desarrollo de la PCR a finales de los años 80 (Mullis *et al.*, 1986), supuso una revolución para la detección, identificación y tipificación de microorganismos. Su potencial aplicación para la detección de patógenos se puso de manifiesto a principios de los 90, con el desarrollo de los primeros cebadores específicos para la detección de *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* y *Shigella* (Hofstra y Huis, 1990). Dichos cebadores se utilizaron para la detección de los patógenos en muestras inoculadas como por ejemplo: *Salmonella* en aves de corral (Fluit *et al.*, 1993) o *E. coli* en aguas y quesos (Meyer *et al.*, 1991), y *L. monocytogenes* en muestras de alimentos de contaminación natural (Rossen *et al.*, 1991). Posteriormente, el desarrollo de las nuevas tecnologías de PCR a tiempo real ha potenciado el interés en la aplicación de la PCR en alimentos ya que el sistema de detección de los amplicones permite la automatización del proceso, además de aumentar el nivel de detección e incluso facilitar la cuantificación del patógeno (Batt, 1997).

Por todo ello, a lo largo de los últimos años, la aplicación de la RTi-PCR para la detección de patógenos en alimentos ha ido en aumento y se han descrito sistemas específicos para los principales patógenos de origen alimentario. No obstante, la mayoría de publicaciones recoge ensayos a partir de cultivos puros o de alimentos

inoculados, mientras que, al igual que en el caso de la PCR convencional, la información respecto a su aplicación en diferentes alimentos de contaminación natural es todavía muy limitada. En la Tabla 5 se muestran algunos de los sistemas de RTi-PCR publicados en los últimos años para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, y *Sta. aureus* tanto en matrices alimentarias como a partir de cultivos puros.

Tabla 5. Sistemas de RTi-PCR publicados en los últimos años para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Sta aureus*.

Patógeno	Diana	Sistema	Matriz	Referencia
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>stxII</i>	Mol.beac.	Leche	Mckillip y Drake, 2000
	<i>stx1 stx2</i>	SYBR G.	Cultivos puros	Jothikumar y Griffiths, 2002
	<i>stx1 stx2 eae</i>	TaqMan	Aguas residuales	Ibekwe <i>et al.</i> , 2002
	<i>stx1 stx2 eae</i>	TaqMan	Ternera y heces	Sharma, 2002
	<i>uidA</i>	Sonda MGB	Cultivos puros	Yoshitomi <i>et al.</i> , 2003
	<i>stx1 stx2 eae</i>	TaqMan	Suelo y agua	Ibekwe y Grieve 2003
	<i>vt1/2</i>	TaqMan	Cultivos puros	Fitzmaurice <i>et al.</i> , 2004
	<i>gapA/B</i>			
	<i>stx1/2 uidA</i>	TaqMan	Cultivos puros	Jinneman <i>et al.</i> , 2003
	<i>stx1 stx2 eae</i>	Kit comercial	Cultivos puros y heces	Bono <i>et al.</i> , 2004
	<i>rfbE</i>	TaqMan	Ternera	Nguyen <i>et al.</i> , 2004
	<i>per</i>	SG y TM	Ternera picada	O'Hanlon <i>et al.</i> , 2004
	<i>sfmD</i>	TaqMan	Cultivos puros	Kacliková <i>et al.</i> , 2005
	<i>stx1 stx2 eae</i>	TaqMan	Aguas residuales	Spano <i>et al.</i> , 2005
	<i>stx1 stx2</i>	TaqMan	Ternera picada	Fitzmaurice <i>et al.</i> , 2006
	<i>uidA</i>	SYBR G.	Cultivos puros	Yoshitomi <i>et al.</i> , 2006
<i>uidA</i>	TaqMan	Ternera	Wang <i>et al.</i> , 2007	
<i>stx</i>	TaqMan	Carne picada*	Stefan <i>et al.</i> , 2007	
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	TaqMan	Leche y agua	Nogva <i>et al.</i> , 2000
	<i>hly</i>	SYBR G	Carne, longaniza	Wang <i>et al.</i> , 2004
	<i>hlyA iap Lin</i>	TaqMan	Cultivos puros	Rodriguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2004a
	<i>hlyA 23S</i>	TaqMan	Carne	Rodriguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2004b
	<i>rRNA</i>			
	<i>hlyA</i>	TaqMan	Salmón	Rodriguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2005
	<i>prfA</i>	TaqMan	Leche, salmón*	Rossmannith <i>et al.</i> , 2006
	Kit comercial	FRET	Ensaladas*	Berrada <i>et al.</i> , 2006a
	<i>actA</i>	TaqMan	Varios*	Oravcová <i>et al.</i> , 2007
<i>ssrA</i>	Hyb probe	Varios*	O'Grady <i>et al.</i> , 2008	

*Muestras de contaminación natural

Tabla 5. (Continuación)

Patógeno	Diana	Sistema	Matriz	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.	<i>InvA</i>	TaqMan	Cultivo puro	Hoorfar <i>et al.</i> , 2000
	<i>InvA</i>	SYBR G.	Carne de ave*	Eyigor <i>et al.</i> , 2002
	<i>InvA</i>	TaqMan	Varios*	Daum <i>et al.</i> , 2002
	<i>InvA</i>	TaqMan	Carne de ave*	Eyigor y Carli 2003
	<i>InvA</i>	TaqMan	Cultivo puro	Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2003
	<i>SipB-SipC</i>	SYBR G.	Carne de ave*	De Medici <i>et al.</i> , 2003
	<i>SipB, SipC</i>	FRET	Precocinados	Ellingson <i>et al.</i> , 2004
	<i>ttr</i>	TaqMan	Varios*	Malorny <i>et al.</i> 2004
	<i>sefA</i>	TaqMan	Huevos	Seo <i>et al.</i> , 2004
	<i>InvA</i>	TaqMan	Leche y carne*	Perelle <i>et al.</i> , 2004
	<i>BAX-PCR</i>	Mol. beac.	Fruta y verdura	Liming <i>et al.</i> , 2004
	<i>InvA</i>	SYBR G.	Carne	Wang <i>et al.</i> , 2004
	<i>InvA</i>	SYBR G.	Leche, ternera	Mercanoglu y Griffiths, 2005
	<i>InvA</i>	SYBR G.	Leche, pienso*	Nam <i>et al.</i> , 2005
	<i>InvA</i>	SYBR G.	Agua	Wolffs <i>et al.</i> , 2006
	<i>sefA</i>	TaqMan	Helado	Seo <i>et al.</i> , 2006
<i>iag</i>	Mol beac.	Pollo	Patel <i>et al.</i> , 2006	
<i>InvA</i>	TaqMan	Carne, salmon, leche cruda	Hein <i>et al.</i> , 2006	
<i>InvA</i>	FRET	Carne, lechuga*	Bohaychuk <i>et al.</i> 2007	
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i>	TaqMan	Queso	Hein <i>et al.</i> , 2001
	<i>nuc</i>	SG y TM	Carne picada	Alarcon <i>et al.</i> , 2006
	<i>nuc</i>	TaqMan	Leche*	Hein <i>et al.</i> , 2005
	<i>Kit comercial</i>	FRET	Restaurantes*	Berrada <i>et al.</i> , 2006b
	<i>Sa0836</i>	TaqMan	Leche	Goto <i>et al.</i> , 2007
	<i>nucA</i>	SYBR G	Queso italiano*	Poli <i>et al.</i> , 2007
	<i>htr</i>		Leche y carne	Chiang <i>et al.</i> , 2007

*Muestras de contaminación natural

5. Limitaciones de las técnicas de PCR

Las técnicas de PCR se han convertido en herramientas habituales para la detección de patógenos, pero su aplicación en alimentos presenta una serie de limitaciones que deben ser consideradas:

5.1 Tamaño de la muestra y niveles de detección

A pesar de ser considerada una técnica muy sensible, la PCR presenta limitaciones en los niveles de detección debido al volumen de muestra con el que se trabaja. Para disponer de entre 1-10 células en los 5 µl que habitualmente se utilizan para la PCR, es necesaria la presencia de al menos 20-200 céls/ml antes de la extracción (Maurer, 2006). Esto implica que en el alimento antes de la homogenización, la carga del patógeno debería ser de al menos 10^3 céls/g, sin tener en cuenta la distribución desigual, que pueden presentar las células en el alimento, y las posibles pérdidas durante el proceso de extracción de DNA.

5.2 Preparación de la muestra para PCR

Para la correcta aplicación de la PCR y/o la RTi-PCR en el análisis de alimentos, es necesario preparar previamente la muestra ya que las matrices alimentarias son muy variadas tanto en composición como en microbiota autóctona. El principal inconveniente que presenta la aplicación de la PCR convencional y la RTi-PCR para el análisis de alimentos es hacer accesible el DNA con una calidad suficiente para el correcto funcionamiento de la reacción. La calidad del DNA extraído a partir de muestras de alimentos se ve condicionada por la presencia de inhibidores de la reacción en la matriz del alimento, el grado de degradación sufrida durante la manipulación y la longitud de los fragmentos de DNA obtenidos (Di Bernardo *et al.*, 2007). Los inhibidores pueden interferir, por un lado, en el proceso de lisis celular, imprescindible para la extracción de DNA, y por otro, degradando los

ácidos nucleicos e incluso afectando directamente a la actividad de la DNA polimerasa (Wilson, 1997). Por ello, el primer paso para establecer un procedimiento de PCR como técnica de análisis rutinario en la detección de patógenos en alimentos, es la selección de un método de extracción óptimo, a ser posible para múltiples matrices y patógenos. Actualmente existen en el mercado una amplia gama de “kits” comerciales que cumplen estos requisitos y que están siendo introducidos progresivamente para la detección por PCR. Los estudios comparativos de la eficiencia de estos métodos se han centrado en matrices vegetales como maíz (Di Pinto *et al.*, 2007; Di Bernardo *et al.*, 2007), animales (Ivanova *et al.*, 2006) y, generalmente, se centran en un solo patógeno como *Salmonella* subsp. *enterica* en pollo (De Medici *et al.*, 2003), en heces (Freschi *et al.*, 2005) y en muestras ambientales (Klerks *et al.*, 2006); *Y. enterocolitica* en carnes (Lucero Estrada *et al.*, 2007); *L. monocytogenes* en carnes y otros tipos de alimentos (Aznar y Alarcón, 2003; Amagliani *et al.*, 2007); *E. coli* O157:H7 en alimentos para el ganado (Trochimchuk *et al.*, 2003); *Sta. aureus* en carnes crudas y productos cárnicos (Alarcón *et al.*, 2006). Sin embargo, en el análisis de alimentos normalmente se investiga más de un patógeno y la sensibilidad de detección de los distintos métodos de extracción varía en función de la especie en estudio (Steffan y Atlas, 1988; Tebbe y Vahjen, 1993). Por eso el método seleccionado ha de asegurar tanto la liberación de los ácidos nucleicos celulares como la eliminación de los inhibidores, en un rango amplio de matrices alimentarias, y ser eficiente para los distintos microorganismos que se pretende detectar. En la Tabla 6 se describen brevemente algunos de los métodos comerciales de purificación de DNA

frecuentemente utilizados en el análisis de muestras de alimentos. Estos métodos se basan principalmente en tres tipos de aproximaciones: i) el calentamiento de la muestra en presencia de una matriz que protege los ácidos nucleicos, y una posterior purificación opcional para eliminar restos de la matriz; ii) la utilización de bolas magnéticas que atraen a los patógenos y permiten su separación de los restos de la matriz del alimento y iii) la utilización de columnas de intercambio iónico que mantienen retenido el DNA mientras se lleva a cabo una purificación a fondo para eliminar posibles inhibidores. Estos últimos, generalmente requieren de una mayor manipulación y un proceso más largo pero, se obtiene un DNA de mayor pureza.

Tabla 6. Métodos comerciales para la extracción de DNA de bacterias.

Casa comercial	Kit	Tiempo	Método	Tipo de muestra o material de partida
Applied Biosystems	PrepMan Ultra	10 min (+ 30 min purificación opcional)	Calentamiento con matriz protectora	
BioRad	AquaPure Genomic DNA isolation kit	30 min		Gram -
	InstaGene Matrix	20 min (+ 30 min purificación opcional)	Calentamiento con matriz protectora	
	QuantumPrep AquaPure		Calentamiento con matriz protectora	
NucleoSpin food kit	Clontech	1 hora 30 min	Columnas de purificación	
Dynal Biotech	Dynabeds DNA direct	10 min tras lisis	Separación con matriz magnética	
Epicentre Technologies	MasterPure DNA purification kit	45 min	Basado en sales y enzimas	Tejidos, bacterias y levaduras
	MasterPure Complete DNA and RNA purification kit	46 min	Centrifugación	Tejidos, bacterias y levaduras
	MasterPure DNA purification kit	2 horas	Precipitación de DNA	Bacterias Gram +
GenPoint	Bugs and Beads		Matriz magnética	
Invitrogen	ChargeSwitch gDNA mini kit bacterial kit	40 min Gram - 2 horas Gram+	Matriz magnética	Gram - y Gram +

Tabla 6. (Continuación)

Casa comercial	Kit	Tiempo	Método	Tipo de muestra o material de partida
MoBio	UltraClean Microbial DNA isolation kit	2 horas	Lisis mecánica y columnas purificación	Hongos, levaduras y bacterias
Norgen Biotek	Bacterial genomic DNA isolation	1 hora	Columnas de purificación	Bacterias
Promega	Wizard Genomic DNA purification kit	1 hora	Solución de precipitación	Tejidos, levaduras bacterias
Qiagen	QIAmp DNA mini kit	1 hora 30 min	Columna de purificación	Bacterias, levaduras, parásitos y virus
	DNeasy Tissue Kit	1 hora 30 min	Columnas de gel de sílice	Tejidos animales, cultivos celulares, insectos, bacterias y levaduras
Roche	DNA Isolation kit for cells and tissue	2 horas 30 min (+ resuspensión)	Eliminación de proteínas y precipitación de DNA	Tejidos, cultivos celulares, bacterias Gram-, levaduras
	MagNA Pure LC isolation kit II	1 hora 30 min	Partículas magnéticas de cristal	Bacterias y Hongos
Sigma	GenElute Bacterial genomic DNA kit	75 min (Gram -) 120 min (Gram +)	Unión a sílice	
Takara	Dr GenTLE	40 min	Precipitación	Sangre y bacterias
Trevigen	Genomic DNA isolation kit		Extracción bifásica	Tejidos, cultivos celulares y bacterias

5.3 Detección de células vivas y muertas

Una de las principales desventajas que presentan las técnicas de PCR, es la incapacidad para diferenciar entre células vivas y muertas (Rudi *et al.*, 2005). Aunque, se ha descrito que el DNA de las células muertas es rápidamente metabolizado por otros microorganismos en ambientes metabólicamente activos (Lebhun *et al.*, 2004), este hecho depende en gran medida del tipo de matriz. Por ello, para asegurar la detección de microorganismos viables, la PCR se puede combinar con un paso de enriquecimiento (Schaad *et al.*, 1995). De este modo se favorece que las células vivas crezcan y se multipliquen aumentando su población relativa con respecto a las células muertas y, por lo tanto, se reduce la posibilidad de falsos positivos. Sin embargo, este paso de enriquecimiento impide la cuantificación del patógeno en la muestra.

Como alternativa, se ha introducido la utilización de etidio monoácido (EMA), un colorante con afinidad por el DNA que penetra en las células muertas o con la pared comprometida y se une al DNA tras un proceso de foto-activación (Nocker *et al.*, 2006a). Esta unión insolubiliza al DNA de modo que éste se elimina en el proceso de extracción junto con los restos celulares. Sin embargo, la utilización del EMA puede llevar a la pérdida de hasta el 60 % del DNA procedente de células vivas (Nocker y Camper, 2006b). Estudios más recientes han descrito que el EMA es tóxico para las células viables lo que ha llevado a introducir la utilización del propidio monoácido (PMA) que no es capaz de atravesar las membranas de las células vivas (Pan y Breidt, 2007).

Otra opción para detectar células viables es la amplificación del RNA ya que este es menos estable que el DNA y se degrada rápidamente

en las células muertas y por tanto, su vida media en los alimentos es más corta. Para esta aproximación, el RNA ribosomal no es el más adecuado ya que permanece estable hasta 48 horas tras la muerte de la célula (McKillip *et al.*, 1998). En ese aspecto, el RNA mensajero (RNAm) es más adecuado como indicador del estado metabólico de la célula. Para la detección del RNAm se requiere de una reacción de PCR con transcripción inversa (RT-PCR) que transforma el RNA en DNA complementario (DNAc), a partir del cual se lleva a cabo la reacción de PCR habitual. Para ello es esencial disponer de una muestra de RNA purificado en la que se elimine completamente el DNA para evitar interferencias, lo que implica un proceso muy laborioso (McKillip y Drake, 2004). Como alternativa, dentro de las técnicas de detección a partir de RNA, destaca la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos, conocida como NASBA (“Nucleic Acid Sequence Based Amplification”) que amplifica de forma selectiva el RNAm incluso en presencia del DNA genómico (Simpkins *et al.*, 2000). Esta técnica tiene la capacidad de detectar microorganismos viables a partir de distintas matrices incluyendo muestras ambientales y de alimentos (Cook, 2003). Sin embargo, la detección del RNAm de las células viables depende del estado fisiológico de éstas (Barer y Harewood, 1999). Así, las células estresadas o las que se encuentran en estado viable no-cultivable, contienen cantidades demasiado bajas de RNAm para su detección. Por este motivo, para la aplicación de esta técnica, es necesario abordar el diseño de cebadores dirigidos a un gen constitutivo que se exprese de igual modo con independencia del estado fisiológico del microorganismo (Deiman *et al.*, 2002).

5.4 Validación de la PCR como técnica de análisis para la detección de patógenos en alimentos.

La aplicación de la PCR para la detección rutinaria de patógenos en alimentos, carece de protocolos estandarizados y validados en distintas matrices (Malorny *et al.*, 2003), por lo que su aplicación es aún escasa en la industria alimentaria. Entre los factores a considerar en la incorporación de un nuevo método para la detección de microorganismos en alimentos están: (Van der Zee y Huis in't Veld, 1997)

- Exactitud, comprende tanto la sensibilidad como la especificidad del método.
- Rapidez, los nuevos métodos deben ser capaces de dar un resultado correcto en un máximo de 24-48 horas.
- Automatización y computación, con el objetivo de procesar el mayor número posible de muestras simultáneamente.
- Costes, en general la inversión inicial para la aplicación de nuevos métodos es considerablemente alta.
- Simplicidad, debe ser de fácil manejo.
- Validación, los métodos alternativos deben ser validados con los métodos estándar y evaluados en estudios colaborativos entre varios laboratorios con el fin de garantizar la exactitud y reproducibilidad de los resultados. En este aspecto se debe dar prioridad al estudio de muestras naturales, ya que de este modo las pruebas se realizarán en las mismas condiciones en las que los usuarios las aplicarán posteriormente.

En cuanto a la validación, en 2003, se aprobó la norma ISO 16140:2003, que define el protocolo para la validación de métodos

alternativos para el análisis microbiológico de alimentos y muestras ambientales. Esta norma facilitó la introducción de nuevas técnicas como la PCR para el análisis de alimentos y abrió el camino a nuevos proyectos entre los que destaca el (FOOD-PCR. <http://www.foodpcr.com>). Este proyecto se centró en la validación de protocolos de PCR para la detección de 5 patógenos frecuentes en alimentos, *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, y *Salmonella* spp. Posteriormente, se aprobó la norma ISO 22174:2005 que detalla los requerimientos generales para la amplificación de ácidos nucleicos aislados de patógenos en alimentos de modo que el proceso sea comparable y reproducible en distintos laboratorios. También en 2005, se aprobó la norma ISO 20836:2005 que establece los requisitos para el funcionamiento y mantenimiento de los termocicladores. Más recientemente, se han detallado los criterios para la preparación de la muestra (ISO 20837:2006) y los requerimientos para la amplificación específica de los ácidos nucleicos así como la confirmación del amplificado (ISO 20838:2006). Además, en los últimos años se han definido los borradores para dos nuevas normas ISO, que aún no han sido aprobadas, y que describen las características de funcionamiento de los métodos moleculares para la detección de patógenos en alimentos (ISO/DIS 22118) así como los requisitos generales y definiciones (ISO/DIS 22119).

5.5 Controles analíticos

Entre los inconvenientes de la aplicación de las técnicas de PCR para la detección de patógenos en alimentos está la posibilidad de

producir falsos negativos. Por ello, es esencial incluir una estrategia de control para una correcta interpretación de los resultados (Murphy *et al.* 2007). En este aspecto, Hoorfar *et al.*, (2004) sugieren la implementación de un control interno de amplificación (IAC) para pruebas de PCR y RTi-PCR. La función primordial de este control es asegurar que los resultados negativos de la prueba no se deban a la presencia de inhibidores de la reacción, mal funcionamiento de reactivos, errores en las temperaturas del equipo u otros factores externos que llevarían a un falso negativo. El Comité Europeo de Estandarización (CEN), en colaboración con la Organización de Estándares Internacionales (ISO) ha propuesto una pauta para la aplicación de la PCR que requiere el IAC como prerrequisito para la estandarización de las técnicas de PCR. Una alternativa es la utilización de control externo de amplificación (EAC) añadiendo DNA diana purificado al extracto obtenido a partir de la muestra del alimento. La amplificación de este control, indica que la reacción se desarrolla correctamente así como la ausencia de inhibidores.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de procedimientos de PCR a tiempo real para la detección y/o cuantificación automatizada de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en el análisis rutinario de alimentos. Para ello se abordarán los siguientes objetivos concretos:

1.- Selección de un método de extracción de DNA adecuado para distintas matrices alimentarias y para la detección de los cuatro patógenos por PCR.

1.1 Extracción de DNA con 4 métodos comerciales, utilizando tres matrices vegetales inoculadas con distintas concentraciones de cada uno de los cuatro patógenos en estudio.

1.2 Comparación de los métodos en base a los niveles de detección, determinados por PCR específica, partir de los DNAs recuperados.

2. Evaluación de la RTi-PCR para la detección directa de patógenos, sin enriquecimiento previo, mediante su aplicación en alimentos de contaminación natural.

2.1 Selección de cebadores específicos y obtención de las rectas patrón de cuantificación, a partir de DNA purificado y de suspensiones celulares calibradas, de cada patógeno.

2.2 Determinación de la sensibilidad de las RTi-PCRs a partir de muestras de alimentos inoculadas con niveles conocidos de cada patógeno.

2.3 Aplicación de la RTi-PCR para la detección de los cuatro patógenos en muestras de alimentos de contaminación natural, sin enriquecimiento previo, y comparación con procedimientos de detección tras enriquecimiento.

3. Desarrollo de sistemas de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea y automatizada de varios de estos patógenos.

3.1 Diseño y puesta a punto de la reacción de RTi-PCR múltiple, para la amplificación equilibrada de las distintas dianas.

3.2 Evaluación de la eficiencia de la RTi-PCR múltiple desarrollada respecto a las reacciones individuales y en su aplicación en alimentos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas utilizadas

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado cepas representantes de los patógenos en estudio así como pertenecientes a géneros cercanos o a géneros que se pueden encontrar en los mismos hábitats que dichos patógenos. Se han incluido en total 198 cepas (103 cepas de referencia y 95 aislados) de los siguientes géneros: *Salmonella* (114), *Staphylococcus* (21), *Listeria* (19), *Bacillus* (16), *Escherichia* (7), *Aeromonas* (6), *Pseudomonas* (5), *Vibrio* (4), *Plesiomonas* (1) *Carnobacterium* (1), *Lactococcus* (1), *Pediococcus* (1), *Lactobacillus* (1) y *Leuconostoc* (1). Todas las cepas utilizadas en este trabajo así como su origen se muestran en la Tabla 7. Las cepas de referencia fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Los aislados de *Salmonella* spp. y los de *Pseudomonas*, proceden de trabajos previos realizados en el laboratorio.

1.1 Condiciones de cultivo

Para las cepas de los géneros *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Escherichia* se utilizó Caldo Triptona Soja (TSB, Pronadisa, Madrid) y Agar Triptona Soja (TSA, Pronadisa, Madrid) para el cultivo en placa. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 18 horas.

Las cepas de bacterias lácticas correspondientes a los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* se cultivaron en medio MRS (Man Rogosa Sharpe, Oxoid, Madrid) líquido y, adicionado con 1,5 % de agar industrial (Pronadisa, Madrid) para el cultivo en placa, incubándose a 30 °C durante 24-48 h, según especie.

Para el género *Carnobacterium* se utilizó Caldo Cerebro Corazón (BHI, Pronadisa, Madrid) y se incubó a 30 °C durante 48 h.

Las cepas de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Bacillus* se cultivaron en Caldo y Agar Nutritivo (NA, Pronadisa, Madrid) durante 24 h a 37°C.

Tabla 7. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Especie	Serotipo	Nº Origen
<i>Aeromonas caviae</i> CECT 838 ^T		Cerdo de Guinea
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> CECT 4255		Heces humanas
<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp. <i>hydrophila</i> CECT 839 ^T		Lata de leche
<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp. <i>anaerogenes</i> CECT 4221 ^T		Emulsión de aceite
<i>Aeromonas media</i> CECT 4232 ^T		Piscifactoría
<i>Aeromonas veronii</i> CECT 4257 ^T		Humano
<i>Bacillus cereus</i> CECT 131		Termo
CECT 148 ^T , CECT 193, CECT 4014, CECT 4094, CECT4387		5 nd
CECT 495, CECT 496		2 Abono de aves
<i>Bacillus thuringiensis</i> CECT 197 ^T		Polilla mediterránea
<i>Bacillus mycoides</i> CECT 4128 ^T		Suelo
CECT 495, CECT 496		2 Abono de aves
CECT 4014, CECT 4094, CECT4387		3 nd
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> CECT 5894 ^T		Leche pasteurizada
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CECT 4134 ^T		Leche cruda
<i>Escherichia coli</i> CECT 515 ^{T*} , CECT 516, CECT 678, CECT 4456*		4 Orina humana
CECT 533*	O103:K:H-	nd
CECT 471	O79:K?:H-	nd
CECT 4267*	O157:H7	Heces
<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 4063 ^T		nd
<i>Lactococcus garvieae</i> CECT 4531 ^T		nd
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> CECT 912 ^T		nd

Tabla 7. (Continuación)

Especie	Serotipo	N°	Origen
<i>Listeria grayi</i> CECT 931 ^T			Heces chinchilla
<i>Listeria innocua</i> CECT 910 ^T	6a		Cerebro de vaca
<i>Listeria ivanovii</i> ssp. <i>ivanovii</i> CECT 913 ^T	5		Oveja
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 ^{T*}			nd
CECT 4939	4c		nd
CECT 940*	4d		Oveja
CECT 4032	4d		Queso fresco
CECT 911*	1/2c		Fluido espinal
CECT 932	1a		Cerdo de Guinea
CECT 934	4a		Oveja
CECT 935	4b		Fluido espinal
CECT 936	1/2b		nd
CECT 937	3b		Niño
CECT 938	3c		nd
CECT 941	6		nd
<i>Listeria seeligeri</i> CECT 917 ^T	1/2b		Suelo
<i>Listeria welsbimeri</i> CECT 919 ^T	6a		Vegetación
CECT 938	3c		nd
CECT 941	6		nd
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i>	cholerasuis	2	nd
CECT 915 ^{T*} , CECT 724			
CECT 409*, CECT 725	typhi	2	nd
CECT 443*	typhimurium		Comida envenenada
CECT 554, CECT 4139, CECT 699	paratyphi	3	Agua residual
CECT 456*	minnesota		nd
CECT 545	abony		nd
CECT 921	braenderup		Heces humanas
CECT 4141	stanley		Alimento
CECT 4151	urbana		nd
CECT 4152	dublin		Bovino
CECT 4153	saint-paul		nd
CECT 4154	virchow		nd
CECT 4155	enterica		nd
CECT 4182	gallinarum		nd
CECT 4374	infantis		Alimento

Tabla 7. (Continuación)

Especie	Serotipo	Nº	Origen
CECT 4565	senftenberg	nd	
<i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> CECT 4395	arizonae		Huevo en polvo
<i>S. enterica</i> ssp. <i>salamae</i> CECT 4000 ^T	daressalaam	nd	
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> S20, S29	enteriditis	2	Agua de mar
S21	senftenberg		Agua de mar
S22	branderburg		Agua de mar
S23, S32	newport	2	Agua de mar
S24	give		Agua de mar
S25, S26	poona	2	Agua de mar
S27	typhimurium		Agua de mar
S28	hadar		Agua de mar
S31	goettingen		Agua de mar
S33	anatum		Agua de mar
<i>Salmonella</i> spp.		7	Agua
S30, S34, S35, S63, S71, S72, S80			
S37, S38, S39, S40, S70		5	Desconocido
S41, S60, S65		3	Humano
S42, S43, S50, S51, S52, S54, S56, S57, S58, S62, S68		11	Pollo
S44, S61, S64, S73, S74, S75, S106, S107		8	Alimentos
S45, S46, S47		3	Harina animal
S48, S49, S53, S55, S66, S69, S92, S93, S94, S108		10	Carne
S59, S67, S81, S82, S83, S84, S85, S86, S88, S89, S95, S96, S99, S100, S101, S102, S103, S105, S109, S110, S111, S112		22	Cerdo
S76, S77, S79		3	Heces
S87, S90, S91, S97, S98, S113 S104		7	Pulmón/hígado
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CECT 4695 ^T		nd	
<i>Plesiomonas shigelloides</i> CECT 4262 ^T			Heces de perro
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 110 ^T , CECT 116		nd	
P3, P5, P7			Aislado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 86 ^{T*}			Fluido pleural
CECT 976			Jamón
CECT 4013*			Glándula mamaria bovina

Tabla 7. (Continuación)

Especie	Serotipo	Nº	Origen
CECT 435			Aislado clínico
CECT 438	1		Artritis séptica
CECT 826, CECT 827*, CECT 828, CECT 4459		4	nd
CECT 4465			Absceso en pierna
<i>Staphylococcus auricularis</i> CECT 4052 ^T			Oreja humana
<i>Staphylococcus carnosus</i> CECT 4491 ^T			Salchicha seca
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT 232 ^T			Hisopo nasal
<i>Staphylococcus hominis</i> CECT 234 ^T			Piel humana
<i>Staphylococcus kloosii</i> CECT 5328 ^T			Piel de ardilla
<i>Staphylococcus pasteurii</i> CECT 5329 ^T			Vómito humano
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> , CECT 235 ^T			Orina
<i>Staphylococcus simulans</i> CECT 4538 ^T			Piel humana
<i>Staphylococcus vitulinus</i> CECT 5330 ^T			Infección de cadera
<i>Staphylococcus warneri</i> CECT 236 ^T			Piel humana
<i>Staphylococcus xylosum</i> CECT 237 ^T			Piel humana
<i>Vibrio cholerae</i> CECT 512	O1		nd
CECT 514 ^T			Heces humanas
<i>Vibrio mimicus</i> CECT 4218 ^T			Oreja humana
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511 ^T	O1:K1		Alimento

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ^T, Cepa tipo

*Cepas utilizadas para los ensayos de especificidad de los cebadores.

nd, no hay datos

2. Análisis de alimentos

2.1 Ensayos de inoculación

2.1.1 Preparación de muestras de alimentos

Se pesaron y cortaron en condiciones estériles 40 gramos de cada una de las muestras y se mezclaron con 360 ml de Agua de Peptona Tamponada, (APT, Pronadisa, Madrid) y se homogeneizaron durante 2 min en una bolsa de plástico estéril con filtro lateral (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche) utilizando un Stomacher (Stomacher Lab-Blender 400, Seward, Londres). El homogeneizado resultante se tomó de la parte filtrada de la bolsa y se distribuyó en alícuotas de 30 ml.

2.1.2 Preparación de cultivos para la inoculación

Se partió en todos los casos de cultivos líquidos de 18 horas de cada uno de los patógenos (*E. coli* O157:H7 CECT 4267, *L. monocytogenes* CECT 4031^T, *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T y *Sta. aureus* CECT 86^T). Se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril (0.8 % NaCl) cubriendo el rango entre 10^2 - 10^9 ufc/ml. A continuación se sembraron 100 μ l de cada dilución, por triplicado, en placas de TSA. Finalmente, se realizó el recuento de colonias en placa tras 24 h de incubación a 37 °C.

2.1.3 Inoculación de las muestras

Ensayos de sensibilidad de los métodos de extracción. Se utilizaron como matrices vegetales brócoli, cebolla y pimiento verde. Una vez homogeneizadas se tomaron alícuotas de 30 ml, se inoculó cada una de estas alícuotas con 30 μ l de las diluciones de cada patógeno por separado cubriendo el rango entre 1 a 10^7 ufc/g. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada una de las muestras inoculadas y se utilizaron para extracción de DNA mediante los cuatro métodos seleccionados. En todos los casos se mantuvo una alícuota sin inocular, como control negativo, para garantizar la ausencia de los cuatro patógenos y evitar así posibles interferencias.

Ensayos de sensibilidad de la RTi-PCR en alimentos. Se realizaron inoculando pimiento verde con diluciones decimales de cada uno de los cuatro patógenos independientemente. Se analizaron 5 μ l del DNA purificado mediante el DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de las alícuotas correspondientes a 0,1- 10^2 ufc/reacción (10 - 10^4 ufc/g).

Ensayos de sensibilidad de la RTi-PCR múltiple. Para determinar la sensibilidad de la RTi-PCR múltiple, se utilizaron como matrices vegetales muestras que resultaron negativas para la presencia de los tres patógenos siguiendo los procedimientos de enriquecimiento y detección por PCR (espinacas, lechuga “little gem” y redina). Tras la homogenización, se inocularon las alícuotas a partir de diluciones de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *S. enterica* ssp *enterica* CECT 915^T y *Sta. aureus* CECT 86^T, cubriendo el rango entre 1 a 10^7 ufc/g para cada patógeno,

en las mismas proporciones o en combinaciones de 10 y 10⁴ (ensayo A) y 10 y 10² (ensayo B) ufc/reacción de los distintos patógenos (Tabla 8). Se incluyó en todos los casos un control negativo sin inocular. Las muestras inoculadas con los tres patógenos en concentraciones similares se consideraron como control positivo para la reacción de amplificación.

Tabla 8. Cantidades inoculadas (ufc/reacción) en los ensayos de sensibilidad de la RTi-PCR múltiple.

A				B			
Inóculo				Inóculo			
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Sta.</i> <i>aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Sta.</i> <i>aureus</i>
1	10	10	10	1	10	10	10
2	10 ⁴	10	10	2	10 ²	10	10
3	10	10	10 ⁴	3	10	10	10 ²
4	10	10 ⁴	10	4	10	10 ²	10
5	10 ⁴	10	10 ⁴	5	10 ²	10	10 ²
6	10	10 ⁴	10 ⁴	6	10	10 ²	10 ²
7	10 ⁴	10 ⁴	10	7	10 ²	10 ²	10
8	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	8	10 ²	10 ²	10 ²
				9	10 ³	10 ³	10 ³
				10	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

2.1.4 Ensayos con enriquecimiento

Para determinar la utilidad de la RTi-PCR múltiple en pruebas de ausencia en 25 g, tal y como exige la legislación en patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, se pesaron y cortaron 25 g de brócoli, espinacas y lechuga “little gem” por cuadruplicado. Estas muestras se homogeneizaron en 225 ml de APT, como se ha indicado previamente, con ayuda de un Stomacher. Tras la homogenización, se inoculó cada

bolsa con cantidades iguales de los tres patógenos en estudio de modo que la bolsa 1 contenía 1 ufc/25 g de cada uno, la bolsa 2, 10 ufc/25 g, la bolsa 3, 100 ufc/25 g y la bolsa 4 se dejó sin inocular como control negativo. Los homogeneizados se incubaron a 30 °C y se tomaron muestras a las 6 y a las 24 h, para la extracción de DNA.

2.2. *Análisis de muestras de contaminación natural.*

En total se recogieron 316 alimentos directamente de industrias de la región de Murcia, durante un periodo de dos años, y fueron analizados en paralelo en el Centro Tecnológico Nacional de la Conserva (CTC, Lab1) y en nuestro laboratorio (IATA, Lab2) como se muestra en la Figura 5. Todas las muestras fueron inmediatamente procesadas en el Lab1 del siguiente modo: se pesaron y cortaron 25 gramos de cada muestra en condiciones estériles y se mezclaron con 225 ml del medio de enriquecimiento correspondiente homogeneizándose en Stomacher. El homogeneizado resultante se distribuyó en alícuotas para su análisis: i) alícuotas de 10 ml se congelaron para el posterior análisis por RTi-PCR en ambos laboratorios, ii) el resto del homogeneizado se incubó en las condiciones adecuadas para el enriquecimiento de cada patógeno (Figura 6) y la posterior detección por mini-VIDAS (Biomérieux, Vitek, Madrid), en el caso de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp., y por el método tradicional de cultivo en el caso de *Sta. aureus*.

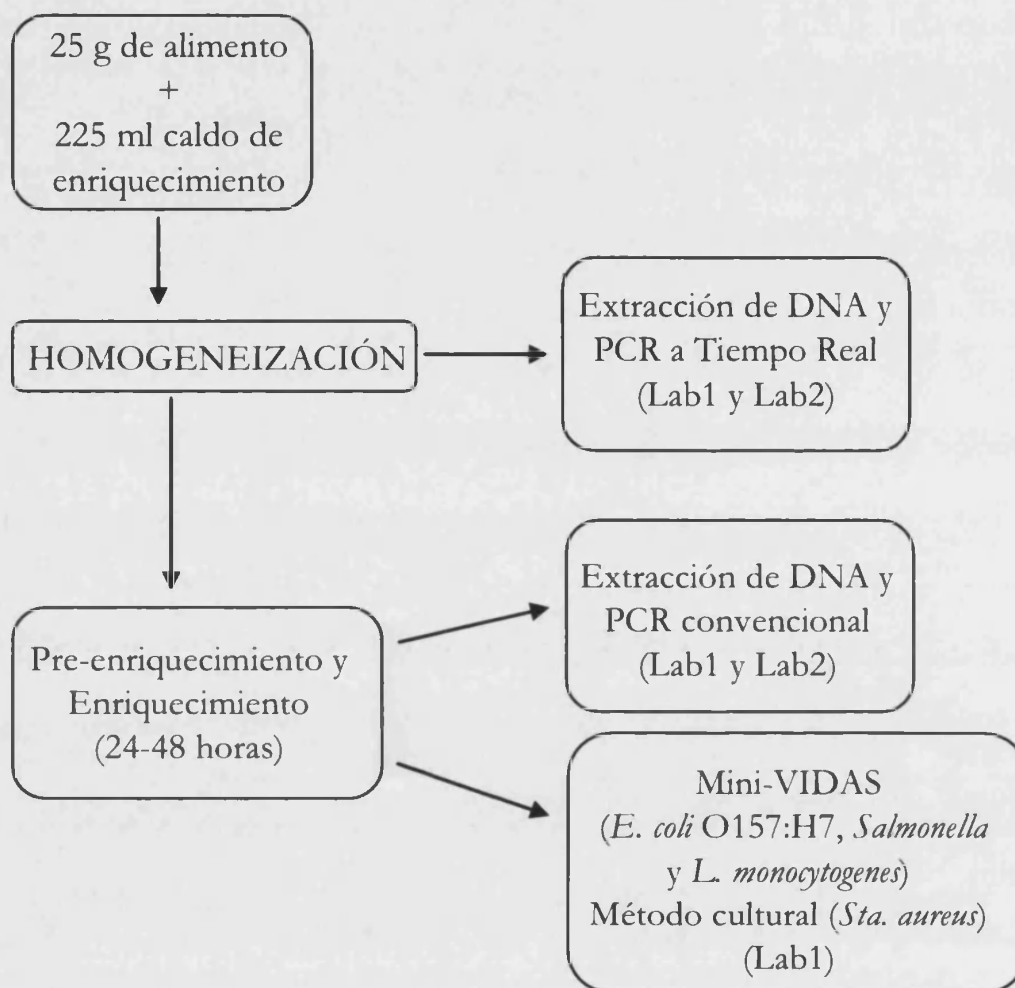


Figura 5. Esquema del procedimiento de análisis de las muestras de alimentos de contaminación natural en el Lab1 y el Lab2.

Se describen a continuación brevemente los procedimientos de enriquecimiento:

- Para *E. coli* O157:H7, la homogeneización se llevó a cabo en caldo TSB con novobiocina (20 mg/l) incubándose durante 6-7 h a 41 °C como pre-enriquecimiento. A continuación se realizó un paso de enriquecimiento transfiriendo 1 ml del caldo pre-enriquecido a 9 ml de caldo MacConkey con cefixima (0,05 mg/l) y telurito potásico (2,5 mg/l) e incubando 18 h a 35-37 °C.

- En el caso de *Salmonella* spp. la homogeneización y el paso de pre-enriquecimiento se llevaron a cabo en APT, durante 18 h a 37 °C. A continuación, el enriquecimiento se realizó en paralelo en dos medios de cultivo: Rappaport-Vasiliadis (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) y Selenite–Cystine (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) durante 6-8 h a 41 y 37 °C, respectivamente. Posteriormente, se transfirió 1 ml de cada uno de estos medios pre-enriquecidos al caldo M (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) y se incubaron 18 h a 41-42 °C. La mezcla de 1 ml de cada uno de estos enriquecimientos se utilizó para la detección por mini-VIDAS.

- Para *L. monocytogenes*, la homogeneización y el paso de pre-enriquecimiento se realizaron en medio Fraser (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) semiconcentrado durante 24 h a 30 °C. A continuación, se transfirió 1 ml de este pre-enriquecimiento a 9 ml de caldo Fraser completo y se incubó 24 h a 30 °C.

- En el caso de *Sta. aureus* la comparación se hizo en base al método de cultivo convencional adaptado de la norma ISO 6888. La homogeneización se llevó a cabo en medio Giolitti-Cantoni (Sigma Aldrich, Madrid) que se incubó a 37 °C durante 24 h. A continuación, se sembraron placas de agar Baird-Parker con emulsión de yema de huevo y telurito potásico (Pronadisa, Madrid). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se tomaron colonias típicas de *Sta. aureus* (colonias de color negro debido a la reducción del telurito sódico a telurio y presencia de un halo claro alrededor de las colonias debido a la lipólisis de la yema de huevo presente en el medio. Alrededor de las colonias se forma también una zona opaca como consecuencia de la formación de un precipitado de sales de calcio y magnesio) realizándose la confirmación

de las colonias mediante la prueba de la coagulasa. Para ello se utilizó el Kit comercial de aglutinación M-IDENT STAPH LÁTEX (Microkit, Madrid): se sembraron tres colonias típicas en Caldo Cerebro-Corazón (BHI) y tras la incubación a 37 °C durante 18-24 h, se tomaron 0,1 ml del cultivo, se mezclaron con 0,3 ml de plasma de conejo y se incubaron a 37 °C durante 6 h. El resultado fue considerado positivo cuando se observó la presencia de un coágulo firme.

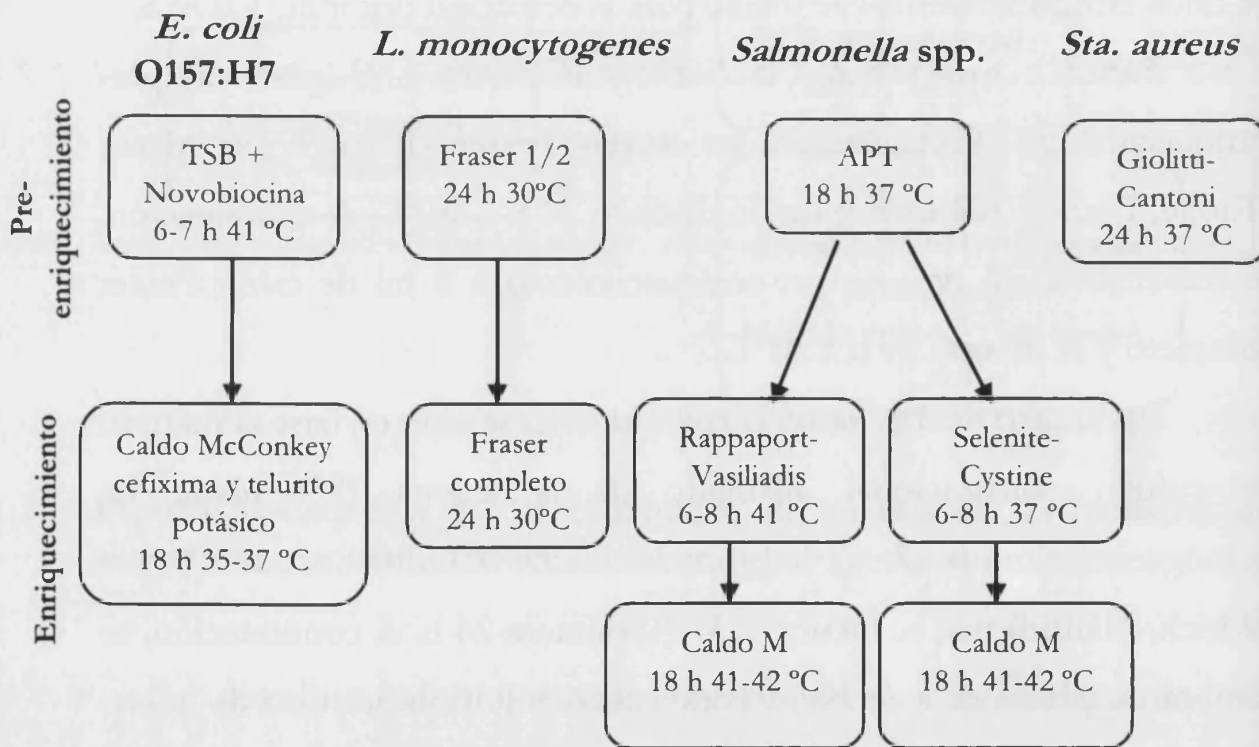


Figura 6. Esquema de los pasos de enriquecimiento realizados para cada patógeno.

Finalizado el enriquecimiento, se separaron alícuotas de 10 ml: i) para el análisis inmediato por mini-VIDAS o método cultural (*Sta. aureus*) en

el Lab1, ii) para congelación y posterior análisis por PCR convencional en Lab1 y Lab2.

Las muestras fueron enviadas por mensajero en menos de 24 horas al Lab2 donde se mantuvieron congeladas no más de una semana hasta su análisis por PCR. Cada laboratorio recibió 10 ml de muestra congelada antes y después del enriquecimiento. Se utilizó 1 ml de estas alícuotas para la extracción de DNA mediante el método DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hiden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El DNA se resuspendió en todos los casos en 100 µl de agua ultra pura (Sigma-Aldrich, Madrid). Cinco µl del DNA purificado se utilizaron para la detección directa mediante RTi-PCR o, tras el enriquecimiento, mediante PCR convencional. La cuantificación del patógeno se realizó en función de la recta patrón obtenida a partir del DNA purificado y cuantificado (apartado 7.3).

3. Extracción de DNA

3.1 A partir de cultivos puros

Para obtener DNA a partir de cultivos puros se utilizó el método descrito por Pitcher *et al.*, (1989). Partiendo del crecimiento en placa, se toma una cantidad de células del tamaño de un grano de arroz. Las células Gram positivas se resuspenden en una solución de lisozima (Aplichem, Darmstadt, Alemania) 50 mg/ml en TE (Tris HCl, 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8) manteniéndolas durante 30 minutos a 37 °C. En el caso de *Sta. aureus* se utiliza lisostafina (Sigma-Aldrich, Madrid) 5 mg/µl en TE. Para las bacterias Gram negativas, este paso previo a la lisis

celular no es necesario. A continuación las células se lisan con 500 µl de reactivo GES (5 mM tiocianato de guanidinio, 100 mM EDTA y 0,5% v/v sarcosil) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la lisis, se añaden 250 µl de acetato de amonio 7,5 M y se mantiene en hielo al menos 10 minutos. Este paso estabiliza los ácidos nucleicos y permite la formación de una capa de proteínas insolubles. A continuación se añaden 500 µl de cloroformo isoamílico (triclorometano y alcohol isoamílico 24:1) para eliminar proteínas y restos de membranas. Tras agitar intensamente, se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos. Esta centrifugación permite la separación de las dos fases quedando el cloroformo isoamílico en la parte inferior y el DNA en la superior, separados por una fina capa que contiene los restos de proteínas y membranas. Se separa cuidadosamente la fase superior, evitando la capa intermedia de proteínas y membranas, y se mezcla con 0,54 volúmenes de isopropanol a -20 °C. Se mezcla cuidadosamente, por inversión durante un minuto, tras lo que se observa el precipitado fibroso del DNA. A continuación se elimina todo el sobrenadante y se lava la fibra de DNA, entre tres y cinco veces, con etanol del 70 % a -20 °C. En el último lavado, se elimina el etanol completamente mediante secado al aire y se resuspende el DNA en 100 µl de agua ultra pura (Sigma-Aldrich, Madrid) durante toda la noche a 4 °C.

3.2 A partir de muestras de alimentos.

En todos los casos, previamente a la extracción del DNA, las alícuotas de 1 ml procedentes de muestras inoculadas y de contaminación natural, se centrifugaron 3 minutos a 13.000 rpm. Tras

eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón TE para su lavado con el fin de eliminar los restos de la matriz del alimento y del medio de cultivo, centrifugándose de nuevo para eliminar completamente el sobrenadante. A continuación se llevó a cabo la extracción de DNA de las células sedimentadas. En el caso de las muestras de contaminación natural se utilizó el método DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Para la extracción de DNA a partir de las muestras de alimentos inoculadas artificialmente se compararon cuatro métodos comerciales. En dos de ellos la extracción se basa en un tratamiento térmico por calor en presencia de una matriz que protege los ácidos nucleicos y en los otros dos, tras una extracción física o enzimática, se emplean columnas de purificación para la recuperación del DNA favoreciendo la eliminación de posibles inhibidores.

3.2.1 Métodos basados en tratamiento por calor

“PrepMan” Ultra (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA) e “InstaGene Matrix” (BioRad, Hercules, California, USA). En ambos casos la extracción comienza con un calentamiento de la muestra hasta 100 °C en presencia de una matriz que protege los ácidos nucleicos. Tras el tratamiento a 100 °C, opcionalmente, se realiza una purificación de los ácidos nucleicos mediante precipitación con acetato de sodio 3 M e isopropanol y un lavado posterior con etanol al 70 %. A continuación se deja secar al aire para eliminar los restos de etanol. Finalmente se resuspende el DNA en 100 µl de agua ultra pura (Sigma-Aldrich, Madrid) y se mantiene a 4 °C durante 24 horas para permitir la disolución del DNA.

3.2.2 Métodos basados en columnas de purificación

“DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania) comienza con dos tratamientos enzimáticos consecutivos para la rotura de las membranas y la eliminación de proteínas (lisozima o lisostafina y proteinasa K). A continuación, el lisado obtenido se introduce en la columna de purificación en presencia de etanol lo que facilita la unión selectiva del DNA a la columna de intercambio iónico.

“UltraClean Microbial DNA isolation kit” (MoBio, Carlsbad, California, US) comienza con un tratamiento mecánico para la rotura de las paredes y membranas celulares en presencia de partículas de sílice y tampón de lisis. Al lisado obtenido se le añade un tampón con alta concentración de etanol y se introduce la mezcla en la columna lo que permite la unión selectiva del DNA a la membrana de la columna.

En ambos casos, una vez que el DNA se encuentra ligado a la columna, se procede al lavado de éste para la eliminación de restos celulares y restos de la matriz del alimento. Se realizan dos lavados con tampones de elevada concentración de etanol para evitar la elución del DNA. Tras los lavados, el DNA se eluye de la membrana con 100 µl de agua ultra pura.

4.- Cuantificación de ácidos nucleicos

4.1 Espectrofotometría

Para estimar la concentración y la pureza del DNA extraído, se utilizó un espectrofotómetro (GeneQuant RNA/DNA calculador, Pharmacia Biotech, Barcelona) y una cubeta de cuarzo Suprasil® de 500

μl (Hellma, Badalona). Se realizaron diluciones 1:100 en agua bidestilada (MilliQ) midiéndose la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Se estimó la concentración de DNA, asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm, en una cubeta de paso de luz de 1 cm, equivale a una concentración aproximada de 50 μg/ml. La pureza de la muestra viene dada por el cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm, siendo óptima cuando dichos valores son mayores o iguales a 1,8. Las desviaciones de este valor son indicativas de la presencia de impurezas proteínicas. Así mismo, una elevada absorbancia a 230 nm puede indicar la presencia de impurezas ya que esta longitud de onda está cerca del máximo de absorbancia de las uniones peptídicas y también puede indicar la contaminación con Tris-HCl, EDTA u otras sales presentes en los tampones utilizados para la extracción.

4.2 Espectrofluorimetría

Con el fin de aumentar la precisión en la cuantificación de DNA, se utilizó el método fluorimétrico comercial “Fluorescent DNA Quantitation Kit” y el espectrofluorímetro VersaFluor® (Bio-Rad). En este caso, la cuantificación se basa en la utilización del fluorocromo bisBenzimida (Hoechst 33258) que presenta la capacidad de unirse específicamente al surco menor del DNA de doble cadena, preferentemente a las secuencias AT. Al unirse al DNA, el fluorocromo cambia su conformación y emite fluorescencia. La variación de fluorescencia se mide utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 460 nm. Para la cuantificación, en primer

lugar se construye una recta patrón utilizando concentraciones conocidas de DNA de timo de ternera. Dicha recta patrón se utilizará para interpolar los valores de fluorescencia obtenidos para las muestras problema de DNA. Este sistema permite la cuantificación del DNA de doble cadena entre 10 ng/ml y 5 µg/ml.

5. Cebadores y sondas

5.1 Selección de cebadores y sondas

Para la detección de los cuatro patógenos por PCR específica se realizó en primer lugar una búsqueda bibliográfica exhaustiva de los cebadores previamente utilizados y como resultado:

a) Para *Salmonella* spp., se seleccionaron como primera aproximación los cebadores ttr4/ttr6 diseñados por Malorny *et al.*, (2004), dirigidos a la región ttrRSBCA del genoma de *Salmonella* spp. localizada cerca de la isla de patogenicidad 2 y que codifica para los genes necesarios para la respiración con tetrionato. Como segunda aproximación se ensayaron los cebadores descritos por Hoofar *et al.*, (2000) que amplifican un fragmento de 119 pb del gen *invA* de *Salmonella*.

b) En el caso de *L. monocytogenes*, se seleccionaron los cebadores descritos por Rodríguez-Lázaro *et al.*, (2004) que amplifican un fragmento de 64 pb del gen *hly* de *L. monocytogenes*.

c) Para *E. coli* O157 se seleccionaron los cebadores y la sonda dirigidos al gen *uidA* que codifica para la β -glucuronidasa diseñados por Jinneman *et al.*, (2003). Este gen es común a todos los serotipos de *E. coli*, pero se ha descrito una mutación en la posición +93 en el serotipo O157:H7. Para su uso en PCR convencional, así como en RTi-PCR en

modo SYBR Green se utilizó el cebador PT2 que cubre esta mutación (Yoshitomi *et al.*, 2006). Para la detección por RTi-PCR en modo TaqMan, esta mutación es reconocida por una sonda MGB que cubre la posición +93.

d) Para la detección específica de *Sta. aureus* se utilizaron los cebadores y la sonda previamente descritos por nuestro grupo (Alarcón *et al.*, 2006). Estos cebadores delimitan un fragmento de 124 pb del gen *nuc* que codifica para una nucleasa termoestable.

Tras la selección bibliográfica de los cebadores (Tabla 9), se comprobó su especificidad mediante PCR convencional utilizando 14 cepas de referencia entre las que se incluyeron representantes de los cuatro patógenos en estudio (Tabla 7). Posteriormente, la especificidad de los cebadores se comprobó mediante RTi-PCR tanto en modo SYBR Green, comprobando la T_m de los amplicones, como en modo TaqMan.

Todos los cebadores fueron sintetizados por Metabión (Martinsried, Germany) y las sondas sintetizadas y marcadas por AppliedBiosystems (Norwalk, CT, USA).

Tabla 9. Cebadores y sondas utilizados en este trabajo.

Microorganismo	Cebador	Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')	Tamaño amplicón	Posición en el gen	T ^a hibridación (°C)	Referencia
<i>E. coli</i> O157:H7	PT2	GCG AAA ACT GTG GAA TTG GG	132	230-250	63	Yoshitomi <i>et al.</i> , 2006
	uidAF	CAG TCT GGA TCG CGA AAA CTG	121	241-261	63	Jinneman <i>et al.</i> , 2003
	uidAR	ACC AGA CGT TGC CCA CAT AAT T		383-362		
	uidAP	NED-ATT GAG CAG CGT TGG-NFQ ^a		266-286		
<i>L. monocytogenes</i>	hlyF	CAT GGC ACC ACC AGC ATC T	64	113-131	63	Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> 2004a
	hlyR	ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA		157-177		
	hlyP	FAM-CGC CTG CAA GTC CTA AGA CGC CA-NFQ ^a		133-155		
<i>Salmonella</i> spp.	ttr6	CTC ACC AGG AGA TTA CAA CAT GG	94	4287-4309	65	Malorny <i>et al.</i> , 2004
	ttr4	AGC TCA GAC CAA AAG TGA CCA TC		4359-4381		
	ttrP5	FAM-CAC CGA CGG CGA GAC CGA CTT T-NFQ ^a		4336-4356		
	JHOL	TCG TCA TTC CAT TAC CTA CC	119	167-186	55	Hoorfar <i>et al.</i> , 2000
	JHOR	AAA CGT TGA AAA ACT GAG GA		234-285		
	JHOP	FAM-TCT GGT TGA TTT CCT GAT CGC A-TAMRA		189-210		
	P1	TTA TTA GGA TCG CGC CAG GC	100	164-184	63	Este estudio
	P3	GGA CCA CGA TCA CCG ATC A		245-264		
	OriP214	VIC-TCA ATG CGT TGG AAA GGA TCA CTA GCT GT-NFQ ^a		213-242		
<i>Sta. aureus</i>	F5	CGC TAC TAG TTG CTT AGT GTT AAC TTT AGT TG	124	342-373	60	Alarcon <i>et al.</i> , 2006
	R465	TGC ACT ATA TAC TGT TGG ATC TTC AGA A		438-465		
	NucP402	FAM-TGC ATC ACA AAC AGA TAA CGG CGT AAA TAG AAG-NFQ ^a		402-434		

^aNFQ: non-fluorecent quencher, silenciador oscuro

5.2 Diseño y especificidad de nuevos cebadores para *Salmonella* spp.

Para el desarrollo de la RTi-PCR múltiple, se diseñaron nuevos cebadores específicos de *Salmonella* spp. Para ello, se utilizó la secuencia del origen de replicación de *Salmonella* spp. procedente de *Salmonella typhimurium* disponible en GeneBank (número de acceso J01808, Zyskind y Smith, 1980). Partiendo de uno de los cebadores diseñados por Widjojoatmodjo *et al.* (1991), se utilizó el programa informático Primer Express, versión 2.0, (Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Corp., California, USA) para diseñar una nueva combinación de cebadores y sonda TaqMan que cumpliera las condiciones adecuadas para RTi-PCR. El análisis de la especificidad de los nuevos cebadores y de la sonda, se llevó a cabo en primer lugar “*in silico*” utilizando la base de datos del NCBI y la herramienta de comparación de secuencias BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e “*in vitro*” mediante amplificación por PCR convencional y por RTi-PCR en modo SYBR Green y TaqMan. En todos los casos, las reacciones se realizaron por triplicado para cada cepa.

6. PCR convencional

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo en 50 µl de una solución que contenía: tampón de PCR 1X (67 mM Tris-HCL, pH 8,8; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween-20), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de una mezcla de dATP, dGTP, dCTP y dUTP, 5 µM de cada cebador, 0,5 U de Taq polimerasa (Bioron, Ludwigshafen, Alemania), 1 U de UDG-glicosilasa (BioLabs, Ipswich, EUA) y 5 µl de la solución de DNA. En todos los casos se incluyó un control negativo de reacción en las mismas condiciones, pero sin DNA molde, y un control positivo con

200 ng de DNA purificado del patógeno correspondiente. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, US) con el siguiente programa térmico: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización del DNA), 45 s a la temperatura de hibridación correspondiente para cada cebador (Tabla 9) y 45 s a 72 °C (extensión), y un último ciclo de extensión de 5 min a 72 °C.

Tras la amplificación, 15 µl de los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % en tampón TAE 0,5X (40 mM Tris-acetato, pH 7,6 y 1 mM Na₂EDTA) durante 30 minutos a 100 V. Se incluyó como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, California) para comprobar el tamaño del amplicón. Los resultados se visualizaron mediante la tinción del DNA por inmersión del gel en una solución de bromuro de etidio en agua destilada (5 mg/ml) durante 20 minutos y posterior iluminación con luz ultravioleta (UV) en un transiluminador (Spectroline, Westbury, USA). La imagen se digitalizó mediante el sistema de captación de imagen GelPrinter Plus, (TDI, Madrid).

7. PCR a tiempo real

7.1 SYBR Green I

La amplificación por RTi-PCR en modo SYBR Green se realizó utilizando “SYBR® Green Core Reagents Kit” (Applied Biosystems, Norwalk), que permite modificar la concentración de los componentes. Se utilizaron 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP, 400 µM de dUTPs,

1X de tampón SYBR Green, 1 U de AmpliTaq Gold y 0,2 U de Amperasa en un volumen final de 20 μ l. Se ensayaron diferentes concentraciones de MgCl₂ para *E. coli* O157:H7 (3; 3,5; 4 y 4,5 mM) y para *Salmonella* (2,5; 3,5 y 4,5 mM) y se mantuvieron las descritas para *L. monocytogenes* y *Sta aureus*.

La reacción de RTi-PCR se llevó a cabo en un equipo GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), formado por un termociclador con bloque térmico peltier de 96 pocillos (GeneAmp® PCR System 9600) junto a un sistema de detección fluorimétrica y captación de imagen CCD (GeneAmp® 5700 Electronics® y GeneAmp® 5700 Sequence Detector). Se utilizó el siguiente programa térmico: Un ciclo inicial de 2 min a 50 °C para activar la Amperasa, un ciclo de desnaturalización de 10 min a 95 °C (se activa la Taq Polimerasa) y 40 ciclos de 15 s de desnaturalización a 95 °C y 1 min a la temperatura de hibridación correspondiente a cada cebador (Tabla 9).

Se añadió un programa térmico para el análisis de las curvas de disociación (T_m) de los amplicones que consiste en: un ciclo inicial de 15 s a 95 °C, un segundo ciclo de 20 s a 60 °C, y un tercer ciclo en el que tiene lugar un incremento paulatino de temperatura desde 60 a 95 °C, en 20 min. Este incremento de temperatura modifica la unión del fluorocromo al DNA debido a la desnaturalización progresiva del DNA de doble cadena. La temperatura a la cual la mitad de las moléculas de DNA están disociadas se conoce como T_m o temperatura de disociación. Esta temperatura es característica de cada amplicón y nos permite detectar la presencia de posibles amplicones inespecíficos así como la formación de dímeros de cebadores.

7.2 TaqMan

La amplificación por RTi-PCR en modo TaqMan se realizó en un volumen final de 20 μ l, utilizando el “TaqMan® Core Reagents Kit”, y las concentraciones de los distintos componentes previamente establecidas para la RTi-PCR en modo SYBR Green junto con las sondas correspondientes en las siguientes concentraciones: para *E. coli* O157:H7, 25 nM de la sonda uidAP; para *L. monocytogenes*, 50 nM de la sonda hlyP y para *Sta. aureus*, 100 nM de la sonda nucP402. Para *Salmonella* se utilizaron las sondas ttrP a 250 nM y, la sonda JHOP que se ensayó a distintas concentraciones (100, 200 y 300 nM) con el fin de optimizar las condiciones de reacción.

7.3 Rectas patrón para cuantificación

Para cuantificar los patógenos en las muestras de alimentos, se construyeron curvas patrón partiendo de: a) DNA total cuantificado fluorimétricamente y b) suspensiones de células de cada uno de los patógenos, cuantificadas por recuento en placa.

7.3.1 A partir de DNA

Se realizó la extracción de DNA mediante DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de 1 ml de un cultivo de 18 h de cada uno de los patógenos. Tras cuantificar espectrofluorimétricamente, se prepararon diluciones decimales seriadas para cubrir el rango entre 1 y 10^6 equivalentes genómicos por reacción. Las correspondencias entre

DNA y equivalentes genómicos se calcularon en base al tamaño molecular del genoma publicado para cada una de las cepas (Tabla 10)

Tabla 10. Tamaño del genoma publicado para los patógenos en estudio.

Patógeno	Tamaño genoma	Referencia
<i>E. coli</i> O157:H7	5,6 fg	Hayashi <i>et al.</i> , (2001)
<i>L. monocytogenes</i>	2,4 fg	Glaser <i>et al.</i> , (2001)
<i>Salmonella</i> spp.	5 fg	McClelland <i>et al.</i> , (2001)
<i>Sta. aureus</i>	1,6 fg	Hein <i>et al.</i> , (2001)

7.3.2 A partir de células

Partiendo de cultivos en fase logarítmica de cada uno de los patógenos, se prepararon diluciones decimales seriadas en solución salina estéril. Se tomó 1 ml de cada dilución y se centrifugó 3 minutos a 13.000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, se lavó el sedimento con tampón TE para eliminar los restos del medio y se extrajo el DNA con el método DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) eluyendo en 100 µl de agua ultra pura (Sigma Aldrich, Madrid). Se tomaron 5 µl de este DNA como molde para la reacción de amplificación. Paralelamente, se realizaron recuentos en placas de TSA para estimar el número de células de partida.

Las rectas patrón para la cuantificación se obtuvieron, en los dos casos, representando gráficamente los valores medios de C_T obtenidos de tres replicados de cada dilución en tres ensayos independientes, frente a la cantidad de células o equivalentes genómicos utilizados en cada reacción de RTi-PCR.



7.4 PCR y RTi-PCR de muestras de alimentos

Para el análisis de alimentos por PCR y RTi-PCR se utilizaron 5 µl del DNA recuperado como se indica en el apartado 3.2 realizándose las reacciones por triplicado. En cada análisis se incluyó un control positivo, con DNA purificado por el método de Pitcher *et al.*, (1989) a partir de un cultivo puro de las cepas *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *L. monocytogenes* CECT 4031^T, *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T y *Sta. aureus* CECT 86^T y un control negativo sin DNA. Como control externo de amplificación, se utilizó 1 ng de DNA purificado del patógeno correspondiente, añadido al extracto de DNA obtenido a partir de la muestra de alimento para asegurar la ausencia falsos negativos por inhibición de la reacción.

8. Mini-VIDAS

El mini-VIDAS es la versión miniaturizada del sistema VIDAS. Se trata de un inmunoensayo enzimático que utiliza el método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) y se realiza de forma automatizada en el inmuno-analizador VIDAS (Biomerieux, Vitek, Madrid). En este trabajo se utilizaron los siguientes “kits” disponibles para los patógenos en estudio: mini-VIDAS ECO (*E. coli* O157:H7), mini-VIDAS LMO (*L. monocytogenes*) y mini-VIDAS SLM (*Salmonella* spp).

En todos los casos se parte del homogeneizado enriquecido, como se indica en el apartado 2.2, y se lleva a cabo el ensayo inmunoenzimático que consiste en una fase sólida, similar a una punta de pipeta, que contiene los anticuerpos. En ella se van mezclando los

reactivos que se encuentran sellados en tiras de pocillos a las que se añade secuencialmente una alícuota del medio de cultivo enriquecido. El patógeno correspondiente actúa como antígeno y, cuando está presente en la muestra, se une a los anticuerpos de la fase sólida. A continuación, se toman en la pipeta los reactivos necesarios para la detección, que incluyen un segundo anticuerpo unido al enzima fosfatasa alcalina que también se une al antígeno. Durante el proceso, la fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del sustrato 4-metil-umbeliferol-fosfato emitiendo fluorescencia al liberar fosfato 4-metil-umbeliferona. La muestra se introduce en el inmunoanalizador VIDAS que mide la fluorescencia a 450 nm lo que constituye el resultado de la detección. Si el resultado de la inmunodetección es positivo, se debe confirmar la presencia del patógeno mediante aislamiento en medios selectivos, a partir del caldo de enriquecimiento, y la identificación de las colonias para dar el análisis como positivo. Para *E. coli* O157:H7 se utilizaron los medios CT-SMAC y SMAC (Biokar, Madrid) donde las colonias típicas presentan color rojizo indicador de que no fermentan el sorbitol; para *L. monocytogenes* el agar Palcam, agar Oxford o agar ALOA; para *Salmonella* spp. el agar XLD (Biolife, Milan, Italia) y el agar Enterico Hecktoen (Scharlau, Barcelona).

9. Análisis estadístico

9.1 Comparación de los métodos de extracción

Para la comparación de los métodos de extracción se realizó un análisis de varianza de medidas repetitivas (ANOVA) considerando el logaritmo neperiano del límite de detección establecido para cada método. Además, se realizó el ajuste de Bonferroni para comparaciones

múltiples con el fin de determinar el efecto del patógeno y de la matriz vegetal en el método de extracción, tanto independientemente como de forma combinada. El nivel de significación de estableció para $P = 0,05$. Se utilizó el programa informático SAS 9.1.

9.2. Comparación de los resultados de PCR, RTi-PCR y mini-VIDAS

Los resultados obtenidos en los dos laboratorios se analizaron estadísticamente para comprobar el grado de concordancia entre ellos. Para ello, se utilizó el índice de concordancia kappa que determina hasta que punto la concordancia observada es superior a la esperable por puro azar. El índice de concordancia kappa se define como:

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

donde P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. De este modo, $k = 1$ indica una concordancia perfecta, $k = 0$ indica que la concordancia obtenida es igual a la esperada por azar y si $k < 0$ el acuerdo observado es menor al esperado. En función del valor del índice kappa obtenido a partir de las comparaciones de los métodos, los resultados se interpretan como se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Grado de acuerdo en función del valor obtenido para el índice kappa.

kappa	grado de acuerdo
<0	sin acuerdo
0-0,2	insignificante
0,2-0,4	bajo
0,4-0,6	moderado
0,6-0,8	bueno
0,8-1	muy bueno

Una vez determinado el grado de acuerdo entre los laboratorios, se estableció la validez de las pruebas diagnósticas comparadas. Para ello se determinó la validez de cada una de ellas, lo que engloba sensibilidad y especificidad definiéndose “sensibilidad” como la proporción de verdaderos positivos que se detectan correctamente y “especificidad” como la proporción de verdaderos negativos detectados correctamente (Altman y Bland, 1994a). Además, para valorar una prueba diagnóstica, es necesario establecer la probabilidad de que cada metodología ofrezca el diagnóstico correcto. Para ello se calculan los valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN). Estos valores indican la proporción de muestras contaminadas y no contaminadas, respectivamente, que se diagnostican correctamente (Altman y Bland, 1994b).

9.3 Comparación de los valores de cuantificación

Los valores de cuantificación por RTi-PCR obtenidos en ambos laboratorios respecto a la curva patrón de DNA, se compararon estadísticamente mediante el contraste no paramétrico de Wilcoxon para

muestras apareadas. El nivel de significación se estableció en $P = 0,05$ utilizando el programa informático SPSS 17.0.

IV. RESULTADOS

1. Comparación de los métodos de extracción

1.1 Sensibilidad de los métodos ensayados

La comparación de los cuatro métodos de extracción de DNA ensayados en este estudio se realizó en base a su eficiencia en la recuperación de DNA, a partir de las muestras de vegetales inoculadas, así como en la adecuación de este DNA para su posterior amplificación por PCR. Para ello, se llevó a cabo la extracción a partir de tres matrices (brócoli, cebolla y pimiento verde) previamente inoculadas con diluciones decimales seriadas de cultivos puros de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *L. monocytogenes* CECT 4031^T, *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T y *Sta. aureus* CECT 86^T, por separado, cubriendo el rango entre 1 y 10⁸ ufc/g. Para facilitar la comparación, el DNA se recuperó en todos los casos en un volumen final de 100 µl de agua ultra pura y se analizaron 5 µl en la reacción de PCR. Los productos de amplificación por PCR convencional específica con los cebadores PT2/uidAR para *E. coli* O157:H7; R465/F5 para *Sta. aureus*; JHOL/JHOR para *S. enterica* ssp. *enterica* y hlyF/hlyR para *L. monocytogenes* se detectaron por electroforesis (Figura 7).

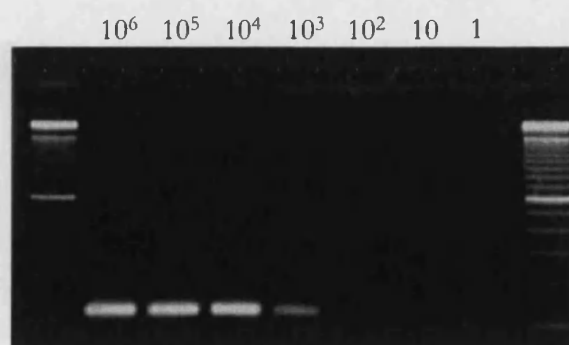


Figura 7. Productos de PCR correspondientes a las distintas concentraciones de *Salmonella* (en ufc/g), inoculada en brócoli, tras la extracción con DNeasy Tissue Kit.

El nivel de sensibilidad se estableció considerando la dilución más alta para la que se obtenía un resultado positivo por PCR. El análisis se comenzó a partir de la alícuota más concentrada y se continuó con las menos concentradas hasta obtener resultado negativo en la amplificación. A partir del primer resultado negativo, se analizaron al menos tres alícuotas más, en orden descendente de concentración para asegurar el resultado. En la Tabla 12 se muestran los resultados de los ensayos de sensibilidad realizados en las tres matrices, por PCR convencional, para cada uno de los cuatro patógenos.

Tabla 12. Valores de sensibilidad (ufc/g) obtenidos por PCR específica en vegetales inoculados artificialmente tras la extracción de DNA por los cuatro métodos

		<i>Salmonella</i> spp.	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Sta.</i> <i>aureus</i>
Pimiento verde	U	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁷
	D	10	10 ⁵	10 ²	10 ⁶
	P	10 ³	10 ⁵	10 ³	-
	I	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵
Brócoli	U	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴
	D	10 ³	10 ⁵	10 ³	10 ⁴
	P	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	-
	I	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵
Cebolla	U	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁴	10 ⁵
	D	10 ³	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
	P	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
	I	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶

U, UltraClean Microbial DNA isolation kit (MoBio); D, DNeasy Tissue Kit (Qiagen); P, PrepMan Ultra (Applied Biosystems); I, InstaGene Matrix (BioRad).

Para *E. coli* O157:H7, con DNeasy Tissue Kit se consiguió la mejor sensibilidad detectándose hasta 10², 10³ y 10⁴ ufc/g en pimiento

verde, brócoli y cebolla, respectivamente. Sólo UltraClean Microbial DNA igualó el resultado, en el caso de la cebolla, mientras que los otros dos métodos rindieron niveles de detección más altos (10^4 y 10^5).

En el caso de *L. monocytogenes*, los valores de detección fueron ligeramente más altos que los obtenidos para *E. coli* O157:H7 con todos los métodos ensayados. Los cuatro métodos se comportaron igual en pimiento verde y brócoli, siendo DNeasy Tissue Kit y PrepMan Ultra los que rindieron mejores resultados permitiendo la detección como mínimo de 10^5 ufc/g. En cebolla, el DNeasy Tissue Kit presentó mayor rendimiento, detectándose desde 10^5 ufc/g mientras que con los otros tres métodos se detectaron 10^6 ó 10^7 ufc/g.

Para *S. enterica* ssp. *enterica*, el mejor nivel de sensibilidad se obtuvo también utilizando DNeasy Tissue Kit, en las tres matrices ensayadas, con valores de detección de 10 ufc/g en pimiento verde y de 10^3 ufc/g, tanto en cebolla como en brócoli. El PrepMan Ultra permitió la amplificación de hasta 10^3 ufc/g en pimiento verde, pero el nivel de detección en cebolla y brócoli fue de 10^6 ufc/g, igualando al resto de métodos ensayados en las diferentes matrices siendo, al menos tres órdenes logarítmicos menos sensibles que el DNeasy Tissue Kit.

Para *Sta. aureus*, la mayor sensibilidad fue de 10^4 ufc/g utilizando DNeasy Tissue Kit, en brócoli y cebolla. Este valor se igualó con UltraClean Microbial DNA en brócoli. Con PrepMan Ultra a partir de pimiento verde y brócoli, no se obtuvo amplificación para ninguna de las concentraciones ensayadas mientras que sí lo hizo en cebolla con una sensibilidad de 10^6 ufc/g. Para confirmar este resultado, se repitió el proceso de inoculación de *Sta. aureus* en pimiento verde y cebolla. Tras

realizar una nueva extracción, mediante los cuatro métodos, se observaron resultados idénticos a los obtenidos en la primera inoculación. El control externo de amplificación, al que se le añadió 1 ng de DNA purificado, presentaba el amplicón esperado por lo que se descartó la presencia de inhibidores de la reacción. Así pues, mediante PrepMan Ultra a partir de brócoli y pimiento verde no se obtuvo DNA o éste no era adecuado para la PCR.

1.2 Análisis estadístico

La comparación de los cuatro métodos de extracción ensayados se realizó en base a sus límites de detección. Para garantizar la validez del análisis estadístico, no se tuvieron en cuenta los resultados de *Sta. aureus* ya que no se obtuvo amplificación, para este patógeno, con uno de los métodos ensayados (PrepMan). Para el análisis estadístico, se expresaron los límites de detección como el logaritmo neperiano de la concentración y se calculó la media de estos logaritmos, en primer lugar, teniendo en cuenta los límites de detección para cada patógeno en todas las matrices y, en segundo lugar, considerando los límites para los tres patógenos en cada matriz vegetal ensayada. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores medios del logaritmo neperiano del límite de detección mostrado por los cuatro métodos de extracción en función de I) patógeno y II) matriz vegetal.

Método ^a	I) Patógeno ^{b, c}		
	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
U	14,6699	14,8978	10,2325
D	6,2271	11,8277	7,1624
P	12,3673	12,5952	11,0000
I	13,9023	14,8978	11,7675

Tabla 13. (continuación)

Método ^a	II) Matriz vegetal ^d		
	Pimiento verde	Brócoli	Cebolla
U	13,5226	12,7550	13,5226
D	6,6148	8,9174	9,6849
P	8,9174	13,5226	13,5226
I	12,7550	13,5226	14,2901

^a **U**, UltraClean Microbial DNA isolation kit (MoBio); **D**, DNeasy Tissue Kit (Qiagen); **P**, PrepMan Ultra (Applied Biosystems); **I**, InstaGene Matrix (BioRad).

^b Cepas utilizadas en los ensayos de inoculación: *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T y *L. monocytogenes* CECT 4031^T.

^c Media de los valores del límite de detección para cada patógeno, en todas las matrices.

^d Media de los valores del límite de detección para cada matriz, en todos los patógenos.

El análisis de varianza de medidas repetitivas (ANOVA), realizado sobre las medias, reveló diferencias significativas entre los cuatro métodos con un valor de $P = 0,002$. Para profundizar en el análisis, se estudiaron independientemente los efectos del patógeno y de la matriz vegetal sobre el método de extracción. En el primer caso, el valor de $P = 0,0157$ indica que el patógeno tiene un efecto significativo sobre la eficiencia mostrada por el método de extracción. En el caso de la matriz el valor de $P = 0,0554$, podría también considerarse significativo (cercano a 0,05). Cuando se analiza la combinación de los efectos del método de extracción y la matriz vegetal no se observan diferencias significativas entre los patógenos ($P = 0,2489$). Cuando se combinan el método de extracción y el patógeno, no hay diferencias significativas en cuanto a la matriz vegetal ($P = 0,1083$). Al comparar los métodos entre sí, considerando los efectos de las matrices y los patógenos combinados (Tabla 14), se observa que los métodos Ultra Clean e InstaGene no mostraron diferencias significativas; InstaGene mostró los mismos resultados que PrepMan y las diferencias entre este último y Ultra Clean

tampoco fueron significativas. Sin embargo, DNeasy Tissue Kit muestra diferencias significativas con cada uno de los otros tres métodos. El valor más bajo de las medias de los logaritmos neperianos de los límites de detección en todos los casos, corresponde a DNeasy Tissue kit (Tabla 13), es decir, es el método que permite niveles de detección significativamente más bajos. Además, aunque no se incluyó en el análisis estadístico, el DNeasy Tissue Kit fue el que rindió un mejor nivel de detección para *Sta. aureus*, en dos de las tres matrices ensayadas. Por lo tanto, se consideró el mejor método para la extracción de DNA de los cuatro patógenos en las tres matrices ensayadas.

Tabla 14. Valores de P para la comparación de los cuatro métodos considerando los efectos de la matriz y de los patógenos de forma conjunta.

	U ^a	D	P	I
U	-			
D	0,004 ^b	-		
P	0,594	0,051 ^b	-	
I	1	0,026 ^b	0,915	-

^aU, UltraClean Microbial DNA isolation kit (MoBio); D, DNeasy Tissue Kit (Qiagen); P, PrepMan Ultra (Applied Biosystems); I, InstaGene Matrix (BioRad).^bValores significativos

1.3 Tiempo y coste del análisis

Considerando el tiempo y la manipulación necesaria para la preparación de la muestra de DNA, los dos métodos basados en calor ensayados en este trabajo (PrepMan Ultra e InstaGene Matrix) son los que resultan más sencillos de manipular y el proceso requiere menos de una hora en ambos casos, incluyendo el paso opcional de purificación de

los ácidos nucleicos. En cuanto a los otros dos, el DNeasy Tissue Kit consta de varios pasos de lisis y lavado por lo que requiere más manipulación alargándose el proceso alrededor de 1 hora y 30 minutos. Respecto al UltraClean Microbial DNA extraction kit consta de un mayor número de pasos de lisis y lavado del DNA, completándose en 2 horas. Además, este método requiere agitación horizontal para el paso inicial de lisis mecánica siendo necesario disponer de un vortex horizontal o en su defecto, adaptar el vortex para mantener los tubos horizontales lo que dificulta ligeramente el proceso.

En cuanto al coste económico, InstaGene Matrix es el más barato seguido de PrepMan Ultra, Ultra Clean y finalmente, el DNeasy Tissue Kit que aproximadamente duplica en precio a los anteriores.

2. Aplicación de la RTi-PCR para la detección de patógenos en alimentos

2.1 Especificidad de los cebadores

Mediante PCR convencional los cebadores seleccionados amplificaron únicamente en las cepas de la especie para la que fueron diseñados, excepto en el caso de los cebadores ttr4/ttr6 de *Salmonella* spp. que también amplificaron en las cuatro cepas de *E. coli* ensayadas. Esta falta de especificidad también se manifestaba al ensayarlos por RTi-PCR en modo SYBR Green.

Para *E. coli* O157:H7 se mantuvieron las condiciones descritas para RTi-PCR por Jinneman *et al.*, (2003), 250 nM de cada cebador y 3,5 mM de MgCl₂. En modo SYBR Green, el análisis de disociación mostraba un único pico para *E. coli* O157:H7 con una T_m de 83,5 °C. Pero también se observó amplificación para *Salmonella* spp. con una T_m de 82,5 °C (Figura 8) por lo que en estas condiciones la reacción no permitía la detección específica ni la cuantificación de *E. coli* O157:H7.

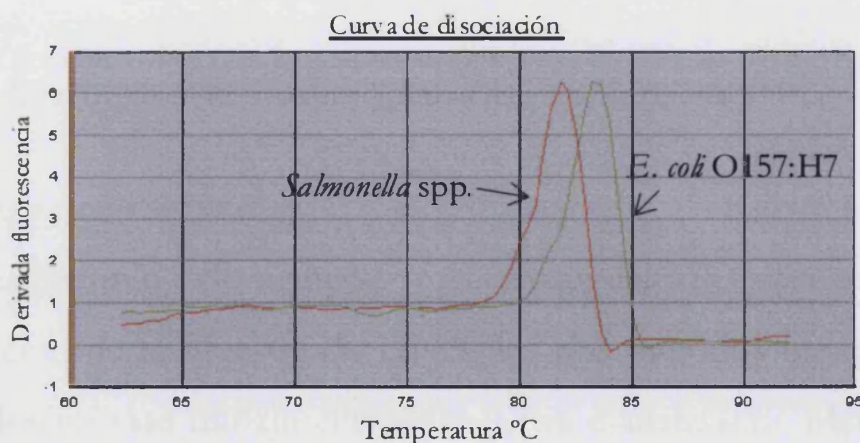


Figura 8. Análisis de disociación de los amplicones generados por RTi-PCR en modo SYBR Green, con los cebadores uidAF/uidAR correspondiente a *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

Para garantizar la especificidad de la RTi-PCR en modo SYBR Green se utilizó la aproximación descrita posteriormente por el mismo grupo (Yoshitomi *et al.*, 2006). Consiste en mantener el cebador uidAR (reverso) y sustituir el directo (uidAF) por un nuevo cebador (PT2) desplazado ligeramente en la secuencia del gen cubriendo la posición +93 que es específica del serotipo O157:H7. Utilizando estos cebadores, con las mismas condiciones de PCR descritas para la combinación uidAF/R, se obtuvo una reacción específica para la que el único pico de amplificación fue el de *E. coli* O157:H7 con una $T_m = 83,3$ °C.

La especificidad se ensayó a continuación en modo TaqMan, utilizando la sonda y las condiciones de reacción descritas por Jinneman *et al.*, (2003). En este caso la sonda cubre la posición +93 y la reacción demostró ser específica ya que sólo la cepa de *E. coli* del serotipo O157:H7 presentó señal de fluorescencia. Sin embargo, los valores de C_T obtenidos en estas condiciones fueron muy altos ($C_T \geq 37$) en todas las cepas, lo que indicaba una baja eficiencia de reacción y un nivel de detección de unas 100 céls/reacción. Para tratar de mejorar el rendimiento de la reacción se ensayaron concentraciones crecientes de $MgCl_2$, manteniendo la concentración de la sonda en 25 nM y utilizando 10 ng de DNA de todas las cepas de *E. coli* y *Salmonella*. Se incluyeron distintos serotipos para asegurar que el incremento en $MgCl_2$ no causaba una pérdida en la especificidad de la reacción (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de C_T obtenidos por RTi-PCR en modo TaqMan con los cebadores uidAF/uidAR y la sonda uidAP específicos para *E. coli* O157:H7, en presencia de distintas concentraciones de $MgCl_2$.

Especie	3 mM	3,5 mM	4 mM	4,5 mM
<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267	20,67	19	18,6	17,9
CECT 515 ^T	40	40	36,8	26
CECT 4456	40	40	40	40
CECT 533	40	40	40	40
<i>S. enterica</i> spp. <i>enterica</i> CECT 915 ^T	39,9	39,5	26,6	18,3
CECT 409	40	40	40	40
CECT 443	40	40	40	40
CECT 456	40	40	40	40

$C_T = 40$ indica resultado negativo

A la vista de los resultados, se consideró que 3,5 mM era la concentración óptima de $MgCl_2$ para esta reacción, dado que no se obtiene señal en el caso de *E. coli* CECT 515^T (no enterotoxigénico). Se observó, un valor de C_T de 39,5 (cercano a 40, considerado como negativo) para *Salmonella* correspondiente a 10 ng de DNA. Para garantizar que la amplificación obtenida para *Salmonella*, no interferiría con la detección y cuantificación de *E. coli* O157:H7, se ensayaron cantidades inferiores de DNA (1 ng, 100 pg y 10 pg) así como un número mayor de cepas de *Salmonella* (Tabla 7) y se observó que no se obtenía señal para ninguna de las cepas de *Salmonella* ni para las cepas de *E. coli* de otros serotipos.

En el caso de *Salmonella*, utilizando los cebadores ttr4/ttr6, mediante RTi-PCR con SYBR Green, se observó un único pico en la curva de disociación de las cepas ensayadas cuya T_m era de 81 °C confirmando lo descrito por los autores, lo que indica la presencia de un solo amplicón.

Sin embargo, en las tres cepas de *E. coli* ensayadas, aparecía un amplicón con una T_m de 74 °C y otro más pequeño una T_m de 81 °C correspondiente a *Salmonella* (81 °C) (Figura 9).

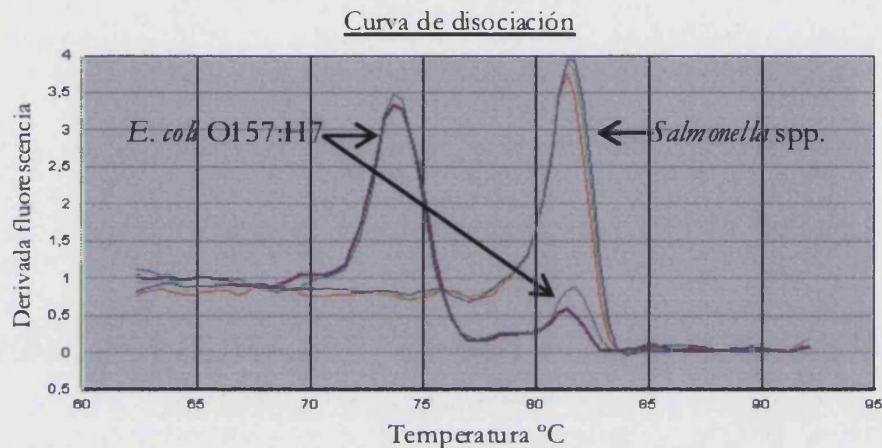


Figura 9. Análisis de la curva de disociación de los amplicones generados por RTi-PCR en modo SYBR Green correspondiente a *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 con los cebadores ttr4/ttr6.

A continuación se abordó la detección mediante RTi-PCR en modo TaqMan (combinando los cebadores y la sonda TaqMan). Esta combinación tampoco permitió diferenciar *Salmonella* spp. de *E. coli* ya que para 100 pg de DNA molde, el valor medio de C_T era de 34 en las tres cepas de *E. coli* ensayadas, frente a 28, en el caso de las cepas de *Salmonella* spp. Esta diferencia en los C_T no es suficiente para garantizar la especificidad de la reacción y podría causar interferencias en la cuantificación de *Salmonella* spp. en las muestras de alimentos. Por todo ello, se ensayó un nuevo par de cebadores, descritos por Hoorfar *et al.*, (2000), dirigidos al gen *invA*. Estos cebadores resultaron específicos por PCR convencional y por RTi-PCR en modo SYBR Green,

confirmándose mediante el análisis de la curva de disociación la presencia de un único amplicón con T_m 79,5 °C para *Salmonella* spp. La reacción en modo TaqMan, utilizando las condiciones descritas por Hoorfar *et al.*, (2000) de 2,5 mM MgCl₂, 300 nM cebadores y 100 nM sonda, no rindió ninguna señal de amplificación por lo que para la optimización se ensayaron nuevas combinaciones de concentración de sonda y de MgCl₂ que se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de C_T obtenidos para *S. enterica* spp. *enterica* CECT 915^T por RTi-PCR en modo TaqMan con los cebadores JHOL/JHOR y la sonda JHOP, a las distintas concentraciones de sonda y MgCl₂ ensayadas.

		MgCl ₂		
		2,5 mM	3,5 mM	4,5 mM
Sonda	100 nM	40	40	28,1
	200 nM	40	40	27,7
	300 nM	40	nt	nt

$C_T = 40$ indica resultado negativo, nt, combinación no testada

Las combinaciones para las que se obtuvo señal fueron las correspondientes a 100 y 200 nM de sonda y 4,5 mM de MgCl₂ por lo que se seleccionaron 100 nM de sonda para los posteriores análisis. Se comprobó de nuevo la especificidad de los cebadores y la sonda utilizando 10 ng de DNA por reacción (unas 10⁶ células) de cada una de las cepas de la Tabla 7. Se observó que para las distintas cepas de *Salmonella* spp. los valores de C_T eran de $17,2 \pm 0,2$ y no presentaba señal para ninguna de las cepas de otros géneros. Por tanto, estas condiciones permitirían la detección específica de *Salmonella* spp. así como su cuantificación.

En el caso de *L. monocytogenes*, se utilizaron 6 mM de MgCl₂, 50 nM de cada cebador y 50 nM de la sonda hlyP siguiendo las condiciones descritas por Rodríguez-Lázaro *et al.*, (2003). En modo SYBR Green la curva de disociación presentó un único pico de T_m en 80,5 °C, para *L. monocytogenes* que corresponde exactamente con el amplicón esperado, y no aparecía ningún tipo de señal en el resto de cepas. Se comprobó también la especificidad y la eficiencia de la reacción en modo TaqMan, con las cepas de referencia que aparecen en la Tabla 7, y sólo se observó señal en las pertenecientes a la especie *L. monocytogenes*, confirmándose la especificidad del sistema.

Para *Sta. aureus* se utilizaron las condiciones descritas previamente (Alarcón *et al.*, 2006) que son: 4 mM de MgCl₂, 300 nM de cada cebador y 100 nM de la sonda nucP402. En este caso, dado que el sistema había sido desarrollado por nuestro grupo, ya disponíamos de la información y experiencia sobre su especificidad.

2.2 Sensibilidad de la RTi-PCR en muestras inoculadas

La sensibilidad de las reacciones de RTi-PCR se evaluó en muestras de pimiento verde inoculadas con los cuatro patógenos, independientemente, y en los que se realizó la extracción mediante el método DNeasy Tissue Kit. Se utilizó el sistema TaqMan y las condiciones establecidas como óptimas para cada patógeno. Para valorar la sensibilidad se analizaron los valores de C_T obtenidos en cada caso. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Valores de C_T obtenidos para los DNA extraídos a partir de las muestras de pimienta verde inoculadas artificialmente.

ufc/reacción ^a	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>	
	C_T	Resultado	C_T	Resultado
10 ²	29,3±0,1	+	32,1±0,5	+
10	33,1±1,4	+	35,4±0,7	+
1	38,4±0,5	+	37,1±0,7	+
0,1	40±0	-	40±0	-

ufc/reacción ^a	<i>Salmonella</i> spp.		<i>Sta. aureus</i>	
	C_T	Resultado	C_T	Resultado
10 ²	30,8±0,6	+	29,8±0,5	+
10	34,1±2,5	+	34,1±0,9	+
1	35±0,3	+	37,3±0,8	+
0,1	40±0	-	40±0	-

^aValores correspondientes a $1,29 \times 10^4$ ufc/g para *E. coli* O157:H7; $1,37 \times 10^4$ ufc/g para *L. monocytogenes*; $2,35 \times 10^4$ ufc/g para *Salmonella* y $3,2 \times 10^4$ ufc/g para *Sta. aureus*.

En los cuatro patógenos ensayados se observó amplificación a partir de 1 cél/reacción lo que corresponde a 10² céls/g de alimento. Este valor se consideró como el límite de detección de las cuatro reacciones ensayadas.

2.3 Curvas estándar de cuantificación

Para abordar la cuantificación de los cuatro patógenos en muestras de alimentos, se construyeron curvas patrón partiendo por un lado de DNA total, purificado mediante DNeasy Tissue Kit y cuantificado fluorimétricamente y, por otro, a partir de diluciones decimales seriadas de cultivos celulares de cada uno de los patógenos, cuantificados por recuento en placa.

Para la construcción de las curvas patrón se representaron los valores medios de C_T en función del logaritmo de las concentraciones ensayadas. A partir de estos datos se calcularon las rectas de regresión asociadas a los puntos así como el coeficiente de correlación para cada una de ellas. La Figura 10 muestra las rectas patrón obtenidas utilizando tanto el modo SYBR Green como el TaqMan, para el DNA purificado y las suspensiones celulares, de los cuatro patógenos. Los valores de las pendientes oscilaron entre -2,84 y -3,58, valores cercanos a -3,32, considerado como el valor óptimo teórico (Higuchi *et al.*, 1993). La eficiencia de la reacción según la formula $E=10^{-1/s} -1$ descrita por Knutsson *et al.*, (2002) calculada a partir de los valores de la pendiente (s), oscila entre 1,24 y 0,9. Los valores del coeficiente de correlación confirman la linealidad de la reacción ya que fueron del 99 % en la mayoría de los casos. Sólo para *E. coli* O157:H7 fueron ligeramente inferiores (96-97 %).

El límite de detección para *E. coli* O157:H7 se estableció en 1 equivalente genómico (eg) ó 10 células/reacción. En el caso de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Sta. aureus* aunque aparecía señal a un nivel inferior (10^{-1} eg/reacción ó 1 cél/reacción), los valores de C_T correspondientes no se incluyeron en las rectas debido a que no se obtuvo amplificación para todas las réplicas y, además, al representar los valores se perdía la linealidad. Considerando los rangos de concentración para los cuales existe una relación lineal con el valor del C_T , se estableció como límite de cuantificación 1 eg/reacción o 10 céls/reacción, para los cuatro patógenos.

En la Tabla 18 se muestra la media de los valores de C_T para las distintas concentraciones de DNA y de células, de los cuatro patógenos obtenidos a partir de 12 réplicas procedentes de 4 ensayos independientes.

Como se observa en la Figura 10, en el caso de *Salmonella* y *Sta. aureus* en modo TaqMan las rectas de regresión obtenidas a partir de DNA y de suspensiones celulares coinciden perfectamente mientras que para *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, la recta de suspensiones celulares se encuentra por encima de la de DNA, en todos los puntos. En modo SYBR Green, estas diferencias se aprecian en todos los patógenos excepto *Salmonella*. Los valores de C_T más altos obtenidos en las suspensiones celulares son esperables debido al paso de extracción de DNA al que son sometidas que sufren estas y que puede ocasionar pérdidas que afecten al rendimiento.

Tabla 18. Valores de C_T obtenidos para las distintas concentraciones de A) DNA cuantificado y B) Suspensiones celulares calibradas

Eq. genómicos	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Sta. aureus</i>	
	SYBR	TM	SYBR	TM	SYBR	TM	SYBR	TM
10 ⁵	15,36±0,28	20,30±0,39	16,92±0,38	17,85±0,57	17,38±0,20	20,11±0,15	16,86±0,45	19,90±0,22
10 ⁴	17,57±0,20	24,29±0,28	20,22±0,54	21,57±0,77	21,20±0,43	22,97±0,69	19,96±0,29	21,89±0,75
10 ³	21,45±0,59	27,24±0,28	23,66±0,57	25,40±0,61	24,42±0,91	27,06±0,54	23,56±0,44	25,40±0,45
10 ²	25,56±0,95	29,95±0,77	27,48±0,71	29,52±0,19	29,79±0,96	29,99±0,64	26,8±0,24	30,26±0,70
10	28,72±0,90	33,24±0,41	31,47±0,95	32,63±0,84	32,51±0,99	32,86±0,68	29,88±0,39	33,81±0,66
1	32,68±0,97	35,94±0,40	35,61±1,01	35,87±0,27	35,41±1,53	36,59±0,72	33,43±0,49	36,63±0,55

Células	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Sta. aureus</i>	
	SYBR	TM	SYBR	TM	SYBR	TM	SYBR	TM
10 ⁷	13,69±0,31	15,09±0,15	14,73±0,17	15,23±0,08	13,99±0,34	15,99±0,92	14,59±0,36	14,15±0,06
10 ⁶	14,69±0,33	18,83±0,39	16,16±0,10	19,31±0,27	18,08±0,16	18,13±0,15	15,39±0,13	15,65±0,65
10 ⁵	17,58±0,08	23,90±0,34	19,97±0,15	22,51±0,40	20,89±0,59	21,79±0,27	18,36±0,44	19,93±0,26
10 ⁴	20,86±0,53	29,48±0,24	22,97±0,22	27,48±0,71	23,42±0,74	24,04±0,99	22,83±0,41	22,91±0,07
10 ³	25,04±0,22	31,66±0,40	26,37±0,44	29,43±0,41	25,45±0,57	26,76±0,26	26,54±0,45	25,97±0,20
10 ²	27,42±0,41	33,65±0,20	29,65±0,33	33,28±0,16	28,08±0,99	29,08±0,14	29,50±0,43	29,06±0,28
10	33,01±1,14	36,00±0,66	33,47±0,73	37,07±0,66	32,93±0,41	33,54±0,78	32,59±0,42	33,68±1,81

Sombreados los valores que no se han incluido en el cálculo de la recta patrón

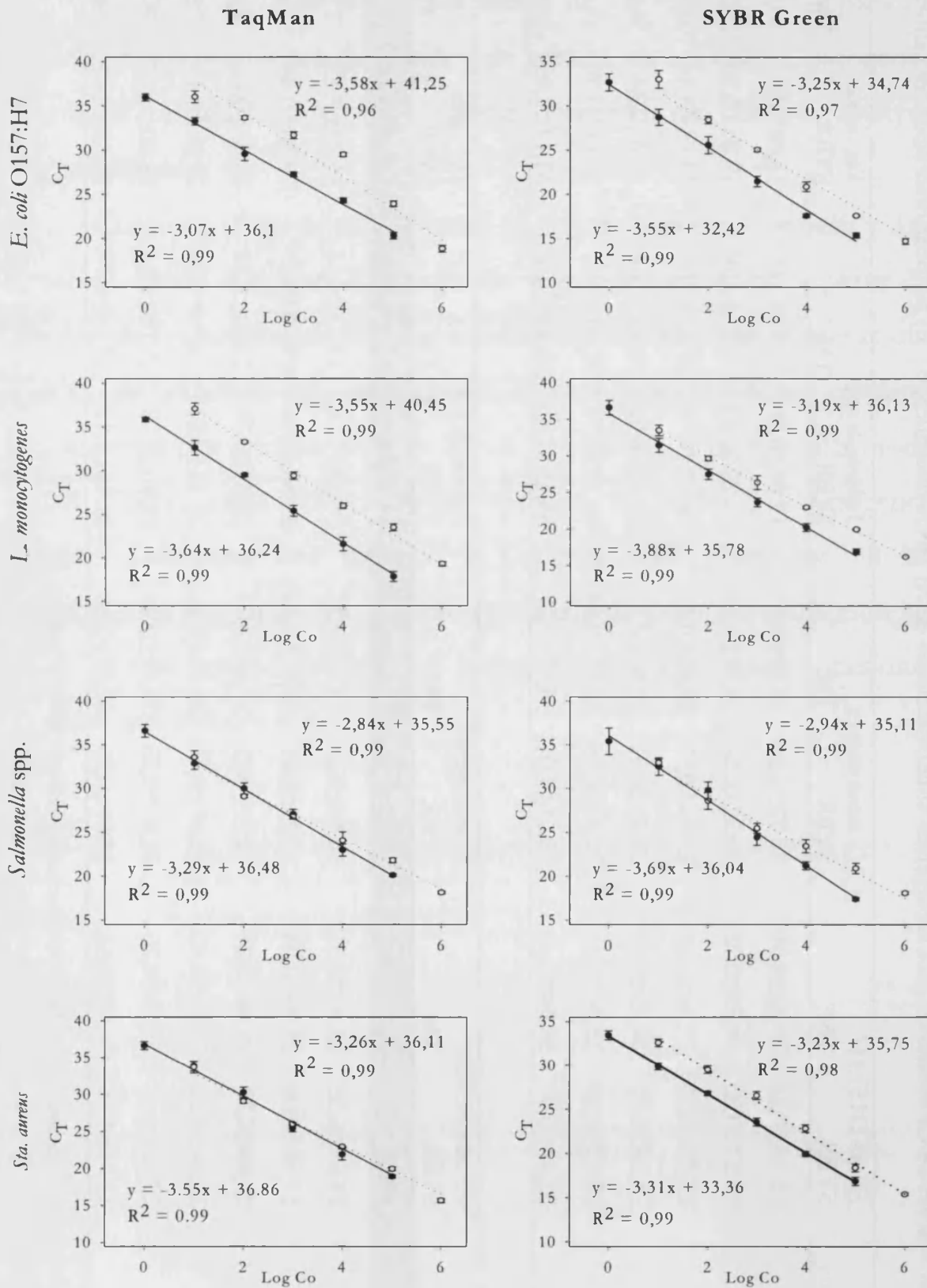


Figura 10. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón a partir de DNA purificado (—) y suspensiones celulares calibradas (···).

2.4 Análisis de muestras de contaminación natural por PCR, RTi-PCR y mini-VIDAS

En este trabajo se han analizado un total de 316 muestras de contaminación natural que incluyen distintos tipos de lechugas y ensaladas (104), verduras y hortalizas (94), especias (50), carnes y derivados (16), pescados (14), aguas y suelos (12), postres (7), y otros (19). De ellas, 113 se analizaron para la presencia de *E. coli* O157:H7, 188 para *L. monocytogenes*, 246 para *Salmonella* y 85 para *Sta. aureus*. Siguiendo el esquema indicado en el punto 2.2 de la sección Material y Métodos, se realizó la detección directa por RTi-PCR antes del enriquecimiento (Lab1 y Lab2) y, tras el enriquecimiento, por PCR convencional (Lab1 y Lab2) y mini-VIDAS (Lab1). Sin embargo, no todas las muestras pudieron ser analizadas por todas las técnicas en estudio por lo que en el análisis estadístico sólo se incluyeron aquellas para las se disponía de los resultados completos (66 para *E. coli* O157:H7, 99 para *L. monocytogenes*, 141 para *Salmonella* y 22 para *Sta. aureus*). En el Anexo II se detallan los resultados para aquellas muestras que resultaron positivas con alguna de las técnicas ensayadas.

Para los cálculos de sensibilidad, especificidad y capacidad diagnóstica de la RTi-PCR y el mini-VIDAS se tomaron los valores de la PCR convencional, tras enriquecimiento, como el “verdadero diagnóstico”. El paso de cultivo previo a la PCR permite el crecimiento de las células vivas respecto de las muertas reduciendo la posibilidad tanto de falsos positivos como de falsos negativos debidos a su presencia en niveles bajos. Se describen a continuación los resultados obtenidos para cada patógeno.

2.4.1 *Escherichia coli* O157:H7

Del total de 113 muestras analizadas para la presencia de *E. coli* O157:H7, 45 (40 %) resultaron positivas por PCR convencional tras el enriquecimiento en el medio selectivo correspondiente. El análisis estadístico se realizó con un total de 66 muestras que habían sido analizadas por las tres técnicas. De éstas, 22 (33 %) resultaron positivas por PCR convencional (Tabla 19).

Los valores del índice kappa obtenidos para la comparación de la PCR y la RTi-PCR en ambos laboratorios fueron 0,867 y 0,705 lo que indica un grado de acuerdo muy bueno entre ambos. Sin embargo, cuando se compararon los resultados de la PCR en el Lab1 y en el Lab2 con los del mini-VIDAS, los valores del índice kappa fueron 0,06 y 0,052, respectivamente, indicando que no hay acuerdo entre ellos. En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos mediante RTi-PCR en ambos laboratorios y mediante mini-VIDAS en el CTC.

Tabla 19. Número de muestras positivas para la presencia de *E. coli* O157:H7 por RTi-PCR y mini-VIDAS

Método de diagnóstico		PCR convencional ^a		Total
		Positivo	Negativo	
RTi-PCR (Lab1)	Positivo	13	0	13
	Negativo	9	44	53
	Total	22	44	66
RTi-PCR (Lab2)	Positivo	13	0	13
	Negativo	9	44	53
	Total	22	44	66
mini-VIDAS (Lab1)	Positivo	1	0	1
	Negativo	21	44	65
	Total	22	44	66

^aResultado considerado como verdadero diagnóstico.

El análisis de la capacidad predictiva (Tabla 20) mostró que la RTi-PCR tiene una especificidad del 100 %, una sensibilidad del 59 %, un VPP del 100 % y un VPN del 83 %. Por su parte, el mini-VIDAS presenta una especificidad del 100 % y una sensibilidad muy baja (4,55 %) en comparación con la RTi-PCR. El VPP del mini-VIDAS es del 100 % al igual que la RTi-PCR pero su VPN es menor (67,69 %).

Tabla 20. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *E. coli* O157:H7 obtenidos para RTi-PCR y mini-VIDAS.

Método de diagnóstico	Validez		Seguridad	
	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
RTi-PCR (Lab1)	59,09 % (36,68-78,52) ^a	100 % (90,00-99,79)	100 % (71,65-99,29)	83,02 % (69,70-91,48)
RTi-PCR (Lab2)	59,09 % (36,68-78,52)	100 % (90,00-99,79)	100 % (71,65-99,29)	83,02 % (69,70-91,48)
mini-VIDAS (Lab1)	4,55 % (0,24-24,88)	100 % (90,00-99,79)	100 % (5,46-89,22)	67,69 % (54,82-78,46)

^a Entre paréntesis se muestran los límites del intervalo de confianza al 95 %.

2.4.2 *L. monocytogenes*

Se analizaron un total de 188 muestras para la presencia de *L. monocytogenes* de las cuales 47 (25 %) resultaron positivas por PCR convencional. El análisis estadístico se realizó con un total de 99 muestras. De ellas, 77 (22 %) resultaron positivas por PCR convencional (Tabla 21).

Los valores del índice kappa para la comparación de la PCR y la RTi-PCR (0,792 y 0,776, respectivamente) demuestran un acuerdo bueno entre ambos laboratorios. Sin embargo, cuando se comparan los

resultados de la PCR en el Lab1 y el Lab2 con los obtenidos mediante el mini-VIDAS, los valores del índice kappa son 0,531 y 0,341, respectivamente, lo que indica, también en este caso, un acuerdo bajo o moderado. En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos mediante RTi-PCR en ambos laboratorios y mediante mini-VIDAS en el Lab1.

Tabla 21. Número de muestras positivas para la presencia de *L. monocytogenes* por RTi-PCR y mini-VIDAS.

Método de diagnóstico		PCR convencional ^a		Total
		Positivo	Negativo	
RTi-PCR (Lab1)	Positivo	19	0	19
	Negativo	3	77	80
	Total	22	77	99
RTi-PCR (Lab2)	Positivo	16	1	17
	Negativo	6	76	82
	Total	22	77	99
mini-VIDAS (Lab1)	Positivo	12	6	18
	Negativo	10	71	81
	Total	22	77	99

^aResultado considerado como verdadero diagnóstico.

Respecto a la capacidad predictiva, los valores de sensibilidad y especificidad (Tabla 22) indican que, aunque el grado de especificidad del mini-VIDAS es muy alto (92,21 %), su sensibilidad es muy inferior a la mostrada por la RTi-PCR (54,55 % frente al 72,73 %). Además, los valores predictivos también son sensiblemente más bajos para mini-VIDAS que para la RTi-PCR lo que demuestra que esta última es más sensible y segura para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos.

Tabla 22. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *L. monocytogenes* obtenidos para RTi-PCR y mini-VIDAS LMO.

Método de diagnóstico	Validez		Seguridad	
	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
RTi-PCR (Lab1)	83,36 % (64,04-6,41) ^a	100 % (94,08-99,88)	100 % (79,08-99,52)	96,25 % (88,68-99,03)
RTi-PCR (Lab2)	72,73 % (49,56-88,39)	98,70 % (91,99-99,93)	94,12 % (69,24-99,69)	92,68 % (84,17-96,99)
mini-VIDAS (Lab1)	54,55 % (32,67-74,93)	92,21 % (83,21-96,79)	66,67 % (41,15-85,64)	87,65 % (78,02-93,60)

^a Entre paréntesis se muestran los límites del intervalo de confianza al 95 %.

2.4.3 *Salmonella* spp.

Se analizaron un total de 246 muestras de alimentos para la presencia de *Salmonella* spp. de las cuales 54 (22 %) resultaron positivas por PCR convencional. El análisis estadístico se realizó con un total de 141 muestras. De ellas, 106 (25 %) resultaron positivas por PCR convencional (Tabla 23).

El índice kappa obtenido para los resultados de PCR y RTi-PCR en ambos laboratorios fue 0,808 y 0,807, respectivamente, lo que de nuevo corrobora un grado de acuerdo muy bueno entre ambos. También en este caso, cuando se comparan los resultados de la PCR en el Lab1 y en el Lab2 con los obtenidos mediante el mini-VIDAS, los valores del índice kappa son 0,065 y 0,112, respectivamente, revelando la falta de acuerdo entre ellos.

Tabla 23. Número de muestras positivas para la presencia de *Salmonella* spp. por RTi-PCR y mini-VIDAS.

Método de diagnóstico		PCR convencional ^a		Total
		Positivo	Negativo	
RTi-PCR (Lab1)	Positivo	28	0	28
	Negativo	7	106	113
	Total	35	106	141
RTi-PCR (Lab2)	Positivo	27	4	31
	Negativo	8	102	110
	Total	35	106	141
mini-VIDAS (Lab1)	Positivo	5	6	11
	Negativo	30	100	130
	Total	35	106	141

^aResultado considerado como verdadero diagnóstico.

El análisis de la capacidad predictiva tanto de la RTi-PCR como del mini-VIDAS (Tabla 24) de nuevo pone de manifiesto la elevada especificidad de ambos sistemas y la menor sensibilidad del mini-VIDAS (14 %) siendo así mismo sus valores predictivos (VPP y VPN), más bajos que los obtenidos para RTi-PCR.

Tabla 24. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *Salmonella* spp. obtenidos para la RTi-PCR y mini-VIDAS.

Método de diagnóstico	Validez		Seguridad	
	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
RTi-PCR (Lab1)	80 % (62,54-90,94) ^a	100 % (95,64-99,91)	100 % (84,98- 99,67)	93,81 % (87,20-97,26)
RTi-PCR (Lab2)	77,14 % (59,45-88,96)	96,23 % (90,06-98,78)	87,10 % (69,24-95,78)	92,73 % (85,74-96,58)
mini-VIDAS (Lab1)	14,29 % (5,38-31,04)	94,34 % (87,59-97,68)	45,45 % (18,14-75,44)	76,92 % (68,56-83,66)

^aEntre paréntesis se muestran los límites del intervalo de confianza al 95 %.

2.4.4 *Staphylococcus aureus*

La detección de *Sta. aureus* se realizó mediante PCR convencional tras enriquecimiento en ambos laboratorios, por RTi-PCR en el Lab2 y por el método tradicional de cultivo en el Lab1. En la Tabla 25 se muestran los resultados de RTi-PCR en el Lab2 y del método de cultivo en el Lab1. Del total de 85 muestras analizadas la presencia de *Sta. aureus*, 19 (22 %) fueron positivas por PCR convencional. En el análisis estadístico se consideraron 22 muestras de las cuales 12 (54 %) fueron positivas por PCR convencional y se obtuvo un valor de $k = 0.459$, es decir, un grado de acuerdo moderado entre los resultados por PCR convencional en ambos laboratorios. Sin embargo, los resultados de la RTi-PCR, de los que sólo se dispone para el Lab2, concuerdan con los del método de cultivo con un valor de $k = 0.697$ lo que indica que en este caso los resultados tienen una concordancia buena

Tabla 25. Número de muestras positivas para la presencia de *Sta. aureus* por RTi-PCR (Lab2) y por el método de cultivo (Lab1).

Método de diagnóstico	PCR convencional ^a		Total	
	Positivo	Negativo		
RTi-PCR (Lab2)	Positivo	8	0	8
	Negativo	4	10	14
	Total	12	10	22
Cultivo (Lab1)	Positivo	6	1	7
	Negativo	6	9	15
	Total	12	10	22

^aResultado considerado como verdadero diagnóstico

Tras el análisis de la capacidad predictiva, se observa que la especificidad de la RTi-PCR es mayor que la del método tradicional de

cultivo siendo también elevado el VPP (Tabla 26). Cabe destacar que el procedimiento de cultivo lleva a dar como resultado la presencia de *Staphylococcus coagulasa* positivos, entre ellos *Sta. aureus* lo que explicaría valores de sensibilidad y VPP elevados e incluso mayores que los obtenidos por mini-VIDAS para otros patógenos.

Tabla 26. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos para la detección de *Sta. aureus* obtenidos para la RTi-PCR (Lab2) y para el método de cultivo (Lab1).

Método de diagnóstico	Validez		Seguridad	
	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
RTi-PCR (Lab2)	66,67% (35,44-88,73)	100,00 % (65,55-99,08)	100 % (59,77-98,84)	71.43 % (42,00-90,42)
Cultivo (Lab1)	50,00 % (22,29-77,71)	90,00 % (54,11-99,48)	85,71 % (42,01-99,25)	60.00 % (32,89-82,54)

^aEntre paréntesis se muestran los límites del intervalo de confianza al 95 %.

2.4.5 Análisis global

La evaluación de la RTi-PCR como técnica diagnóstica para el análisis de alimentos se realizó en base a los resultados globales obtenidos para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (Tabla 27), y su comparación con el mini-VIDAS, procedimiento adoptado por la AOAC. Ambas técnicas mostraron una especificidad muy alta (94, 71 y 100 % para mini-VIDAS y RTi-PCR, respectivamente). Sin embargo, la RTi-PCR tiene una mayor sensibilidad y sus VPP y VPN son más altos que los mostrados por el mini-VIDAS.

Tabla 27. Resultados del análisis estadístico de los valores predictivos globales para RTi-PCR y mini-VIDAS.

Método de diagnóstico	Validez		Seguridad	
	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
RTi-PCR	75.95 % (64,78-84,55)	100.00 % (97,93-99,96)	100.00 % (92,50-99,85)	92.28 % (88,01-95,16)
mini-VIDAS	22.78 % (14,41-33,85)	94.71 % (90,72-97,11)	60.00 % (40,75-76,78)	77.90 % (72.45-82,56)

^a Entre paréntesis se muestran los límites del intervalo de confianza al 95 %.

2.5 Cuantificación de las muestras

En el Anexo II se detallan las muestras de alimentos de contaminación natural que han sido positivas por alguno de los métodos utilizados así como los valores de cuantificación por RTi-PCR. El análisis estadístico de los resultados de cuantificación obtenidos en ambos laboratorios, se realizó con las 66 muestras analizadas para *E. coli* O157:H7 y las 141 de *Salmonella* spp. dado que no se disponía de los datos del Lab1 para *L. monocytogenes* y *Sta. aureus*. El test de homogeneidad de Wilcoxon permitió aceptar la “hipótesis nula de homogeneidad de resultados” con un valor de P de 0,955 y 0,918 para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp., respectivamente. Esto indica que no existen diferencias significativas entre la cuantificación obtenida en ambos laboratorios. Al realizar el análisis conjunto de los resultados obtenidos para los dos patógenos, se obtuvo un valor de $P = 0,952$, demostrando la reproducibilidad de la técnica.

Para estimar los niveles en que se encuentran cada uno de los patógenos de modo natural en alimentos se han considerado los datos

obtenidos en el Lab2 (Anexo II) que incluyen un total de 136 muestras positivas por PCR convencional. De ellas, 67 % fueron positivas por RTi-PCR directa, sin enriquecimiento, y se cuantificaron respecto a las curvas patrón de DNA. En la Tabla 28 aparecen los resultados de cuantificación por RTi-PCR de los cuatro patógenos en alimentos de contaminación natural.

Tabla 28. Niveles de cuantificación de los cuatro patógenos en muestras de alimentos de contaminación natural.

Nivel de cuantificación (ufc/g)	<i>E. coli</i> O157:H7 (40) ^a	<i>L. monocytogenes</i> (35)	<i>Salmonella</i> spp. (47)	<i>Sta. aureus</i> (14)
<10 ^b	19 (47,5 %)	8 (23 %)	14 (30 %)	4 (29 %)
10	5 (12,5 %)	10 (28 %)	7 (15 %)	10 (71 %)
10 ²	5 (12,5 %)	15 (43 %)	7 (15 %)	-
10 ³	7 (17,5 %)	2 (6 %)	15 (32 %)	-
10 ⁴	3 (7,5 %)	-	4 (8 %)	-
10 ⁶	1 (2,5 %)	-	-	-

^aNúmero de muestras analizadas por RTi-PCR.

^bMuestras positivas por PCR convencional tras enriquecimiento y negativas por RTi-PCR. Se asume que presentan niveles inferiores a 10 ufc/g y no son detectadas por RTi-PCR.

El 18 % de las muestras positivas para *E. coli* O157:H7 y el 32 % para *Salmonella* presentaban niveles de cuantificación de 10³ ufc/g. En ambos casos, aunque en menor proporción (8 %), se detectaron niveles de 10⁴ ufc/g y, sólo en una muestra de brócoli, 10⁶ ufc/g de *E. coli* O157:H7. Niveles inferiores a 10 ufc/g, por debajo del nivel de detección de la RTi-PCR, se observaron para *E. coli* O157:H7 en el 48 % de las muestras y para *Salmonella* en el 30 %. En el caso de *L. monocytogenes*, se observan niveles de 10² ufc/g en el 43 % de las muestras mientras que niveles inferiores a 10 ufc/g en el 23 %. Aunque el número

de muestras analizadas para *Sta. aureus*, comparativamente fue muy bajo, cabe destacar su presencia en niveles de 10 ufc/g (71 %) o inferiores (29 %).

3. Desarrollo de una reacción de RTi-PCR múltiple para la detección de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus* en alimentos

El diseño de la RTi-PCR múltiple utilizando sondas marcadas, está limitado, entre otros aspectos, por las características del equipo utilizado. Considerando las características del Abi Prism 7000 de que disponíamos, que permite la lectura en tres canales, el diseño de la RTi-PCR se limitó a una reacción múltiple para la detección de tres patógenos. Las primeras aproximaciones a la RTi-PCR múltiple se realizaron en modo SYBR Green probando combinaciones de los cebadores utilizados hasta el momento. Se estableció 63 °C como temperatura de hibridación para garantizar la especificidad de los cebadores de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* y se observó que a esta temperatura, los cebadores específicos de *Sta. aureus* funcionaban de forma eficiente pero los de *Salmonella* no. Por otra parte, el análisis de las curvas de disociación en este sistema no permitía diferenciar *Salmonella* de *L. monocytogenes*. Otro punto a considerar fue el hecho de que, en caso de que resultara necesario hacer un enriquecimiento de la muestra previo a la detección por RTi-PCR, *Salmonella*, *Sta aureus* y *E. coli* O157:H7 pueden ser enriquecidos en APT como se demostró posteriormente, mientras que *L. monocytogenes* tiene un crecimiento más lento y requiere de medios selectivos para su correcto desarrollo. Por todo ello, se optó por

el desarrollo de una RTi-PCR múltiple para *Salmonella*, *Sta. aureus* y *E. coli* O157:H7. Para ello fue necesario diseñar un nuevo par de cebadores específicos de *Salmonella* que pudieran amplificar a 63 °C para mantener la especificidad los demás cebadores.

3.1 Diseño de cebadores y sonda específicos para *Salmonella* spp.

Partiendo de la secuencia del origen de replicación de *Salmonella* spp., se obtuvieron distintas combinaciones de cebadores y sonda. Se diseñó un nuevo cebador (P3) y una sonda (OriP214) que junto al cebador P1 (Widjoatmodjo *et al.*, 1991) permitían su utilización en las condiciones de la RTi-PCR múltiple. Los cebadores seleccionados amplifican un fragmento de 100 pb y fueron sintetizados por Metabion (Martinsried, Alemania).

3.1.1 Comprobación la especificidad

3.1.1.1 *In silico*

La especificidad de la sonda (OriP214) y el cebador (P3) diseñados en este estudio se ensayaron en primer lugar “*in silico*” mediante la herramienta BLAST de la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) observándose que tan sólo presentaban homología con las secuencias correspondientes a los distintos serotipos de *Salmonella*.

3.1.1.2 *In vitro*

Una vez determinada la especificidad de los cebadores “*in silico*”, se comprobó la especificidad mediante PCR convencional. Para ello, se utilizaron un total de 198 cepas incluyendo 114 *Salmonella* spp. (22 cepas

de referencia y 92 aislados), 21 *Listeria* spp., 20 *Staphylococcus* spp., 11 *Bacillus* spp., 7 *E. coli*, 6 *Aeromonas* spp, 4 *Vibrio* spp, 5 *P. aeruginosa* (2 cepas de referencia y 3 aislados) y 1 *Plesiomonas shigelloides*. El amplicón de 100 pb correspondiente, se obtuvo únicamente en las cepas de *Salmonella* spp. Además, la especificidad se ensayó por RTi-PCR en las 103 cepas de referencia (22 cepas de *Salmonella* y 81 de otros géneros, Tabla 7) En primer lugar utilizando el sistema SYBR-Green I, el análisis de la curva de disociación mostró una temperatura de fusión (T_m) que oscila entre 80,1°C y 80,3 °C para las 22 cepas de referencia del género *Salmonella* (Figura 11), mientras que no se produjo amplificación en el resto de cepas ensayadas.

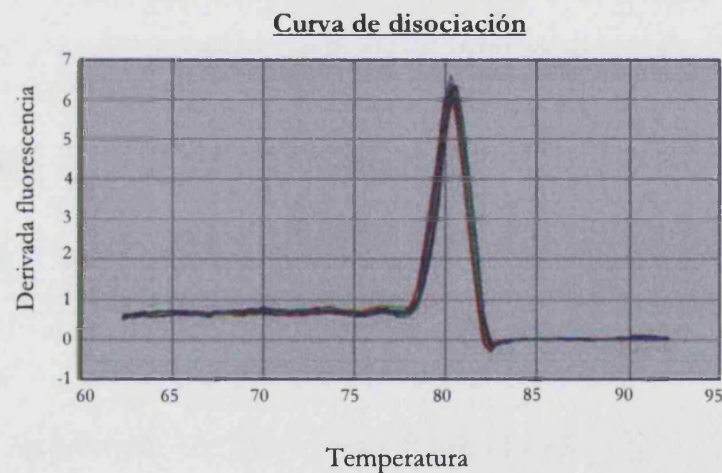


Figura 11. Análisis de las curvas de disociación de los amplificados obtenidos para las 22 cepas de referencia de *Salmonella* spp.

Posteriormente, se comprobó la especificidad mediante el modo TaqMan utilizando la sonda OriP214 diseñada en este estudio. La media de los valores de C_T obtenidos en las cepas de *Salmonella* spp. fue $14,81 \pm$

0,52 y no se observó señal de amplificación para ninguna de las cepas ensayadas pertenecientes a otros géneros.

3.1.2 Sensibilidad de la RTi-PCR desarrollada para la detección de *Salmonella*

Para determinar la sensibilidad de la nueva reacción diseñada en este estudio, se construyeron curvas patrón partiendo, por un lado, de DNA total cuantificado fluorimétricamente y por otro, de diluciones decimales seriadas de un cultivo de la cepa *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T cuantificado por recuento en placa. En la Tabla 29 se muestran las medias de los valores de C_T obtenidos a partir de 9 réplicas procedentes de 3 ensayos independientes.

Tabla 29. Valores de C_T obtenidos para las distintas concentraciones de DNA y células de *S. enterica* subsp. *enterica* CECT 915^T ensayadas en modo TaqMan y SYBR Green.

Concentración ^a	DNA		Células	
	SYBR Green	TaqMan	SYBR Green	TaqMan
10 ⁷	nd	nd	14,97±0,52	15,43±0,21
10 ⁶	nd	nd	17,33±0,39	18,10±0,61
10 ⁵	17,11±0,18	20,01±0,55	19,96±0,61	21,02±0,69
10 ⁴	20,34±0,94	22,43±0,64	22,55±0,79	24,11±0,37
10 ³	23,74±1,08	25,87±0,43	24,54±0,66	26,96±0,97
10 ²	26,49±1,09	29,40±0,64	27,08±0,49	28,96±0,27
10	29,84±0,67	32,27±0,85	31,69±0,49	33,08±0,79
1	33,67±0,89	35,23±0,85	35,90±0,91	37,28±1,05

^aEg o céls/reacción; nd, no determinado; sombreado, valores que no se incluyeron en el cálculo de la recta patrón.

Las curvas estándar se construyeron representando el valor de C_T en función del logaritmo de la concentración correspondiente. Posteriormente, se calcularon las rectas de regresión asociadas a los

puntos así como el coeficiente de correlación para cada una de ellas. La Figura 12 muestra las rectas patrón obtenidas tanto en modo SYBR Green como TaqMan, para el DNA purificado y las suspensiones celulares.

Los valores de las pendientes oscilaron entre -2,65 y -3,58, valores cercanos a -3,32, considerado como el valor óptimo teórico (Higuchi *et al.*, 1993). Por otro lado, la linealidad de las reacciones se confirmó con los valores del coeficiente de correlación que en todos los casos fueron muy cercanos a 1.

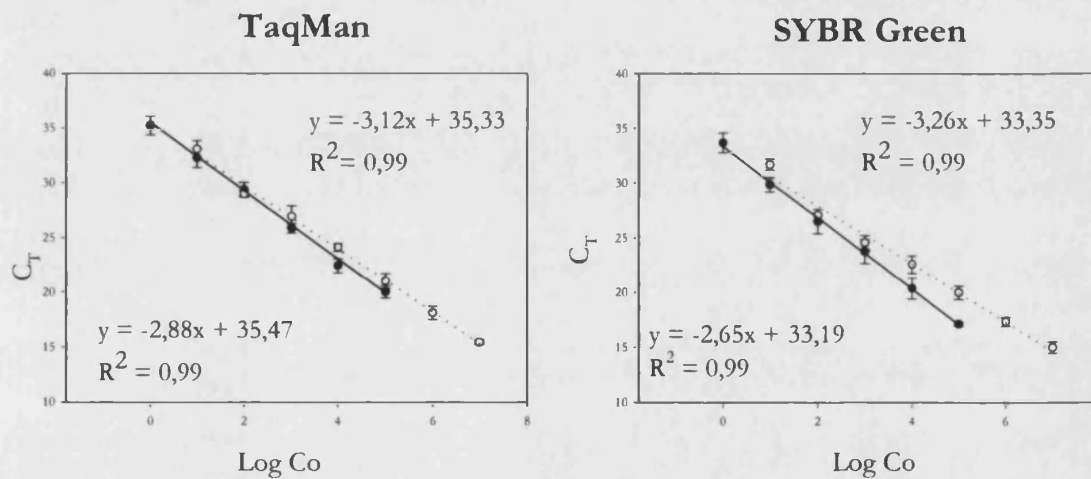


Figura 12. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón a partir de DNA purificado (—) y suspensiones celulares calibradas (····).

Con el fin de comprobar la eficiencia de los nuevos cebadores para el análisis de *Salmonella* spp. en alimentos, se analizaron un total de 15 muestras naturales y se compararon los resultados con los de los cebadores JHOL/R. Como se observa en la Tabla 30, las 12 muestras positivas para *Salmonella* spp., coinciden con ambos sistemas. No obstante, los valores de C_T correspondientes al nuevo sistema P1/P3/OriP, son ligeramente inferiores dando valores de cuantificación

del mismo orden logarítmico en 10 de las muestras y de dos órdenes logarítmicos superiores en las otras dos muestras restantes. Estos resultados sugieren un rendimiento igual o incluso mejor de la nueva reacción diseñada en este estudio.

Tabla 30. Detección de *Salmonella* spp. en muestras naturales analizadas mediante RTi-PCR en modo TaqMan con los cebadores P1/P3 y la sonda OriP y los JHOL/R.

Muestra	JHOL/R/P		P1/P3/OriP	
	C _T	Concentración ^a	C _T	Concentración ^a
Brócoli	36,71 ± 0,17	3,4	31,80 ± 0,54	19
Brócoli	34,10 ± 1,99	61,5	31,23 ± 0,76	73,8
Brócoli	34,02 ± 0,79	67,6	31,11 ± 0,23	77,9
Col Milán Salima	40,00 ± 0,00	0	40,00 ± 0,00	0
Col picuda	29,30 ± 1,09	166,2	28,20 ± 0,80	176,2
Col picuda	33,20 ± 0,81	69	30,10 ± 0,43	75,6
Coliflor	29,45 ± 0,56	120	26,35 ± 0,44	133,8
Coli-Rábano	29,88 ± 0,77	109,9	26,78 ± 0,27	134,8
Espinacas	40,00 ± 0,00	0	40,00 ± 0,00	0
Lechuga romana	38,90 ± 0,11	0,7	28,83 ± 0,69	154,1
Morrison little	40,00 ± 0,00	0	40,00 ± 0,00	0
Pavo	34,40 ± 1,13	24,5	31,84 ± 1,22	22,18
Pechuga de pollo	32,80 ± 0,41	46,1	29,97 ± 0,32	68,02
Pimiento tricolor	32,50 ± 2,2	90,1	28,63 ± 0,15	167,12
Rucola	38,34 ± 2,2	1,8	28,81 ± 0,86	159,3

^aValor medio de cuantificación en cels/g

3.2 Optimización de la RTi-PCR múltiple

Mediante el sistema SYBR Green, los mejores resultados para la reacción de RTi-PCR múltiple se obtuvieron utilizando 3,5 mM MgCl₂, 100 nM de cada uno de los cebadores específicos para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. y 300 nM de los cebadores específicos para *Sta. aureus*. En estas condiciones, el análisis de la curva de disociación para *Sta. aureus* CECT 86^T, *S. enterica* ssp. *enterica* 915^T y *E. coli* O157:H7 CECT 4267 en

amplificaciones independientes, mostró temperaturas de fusión (T_m) de 77, 80,3 y 83,3 °C, respectivamente. Cuando se realizó el análisis de disociación de la RTi-PCR múltiple, se observaron los mismos valores de T_m por lo que los productos de amplificación de los tres patógenos son claramente diferenciables. En la Figura 13 se muestra la representación de la curva de disociación obtenida para las distintas combinaciones de los tres patógenos utilizando 1 ng de DNA purificado de cada uno de ellos.

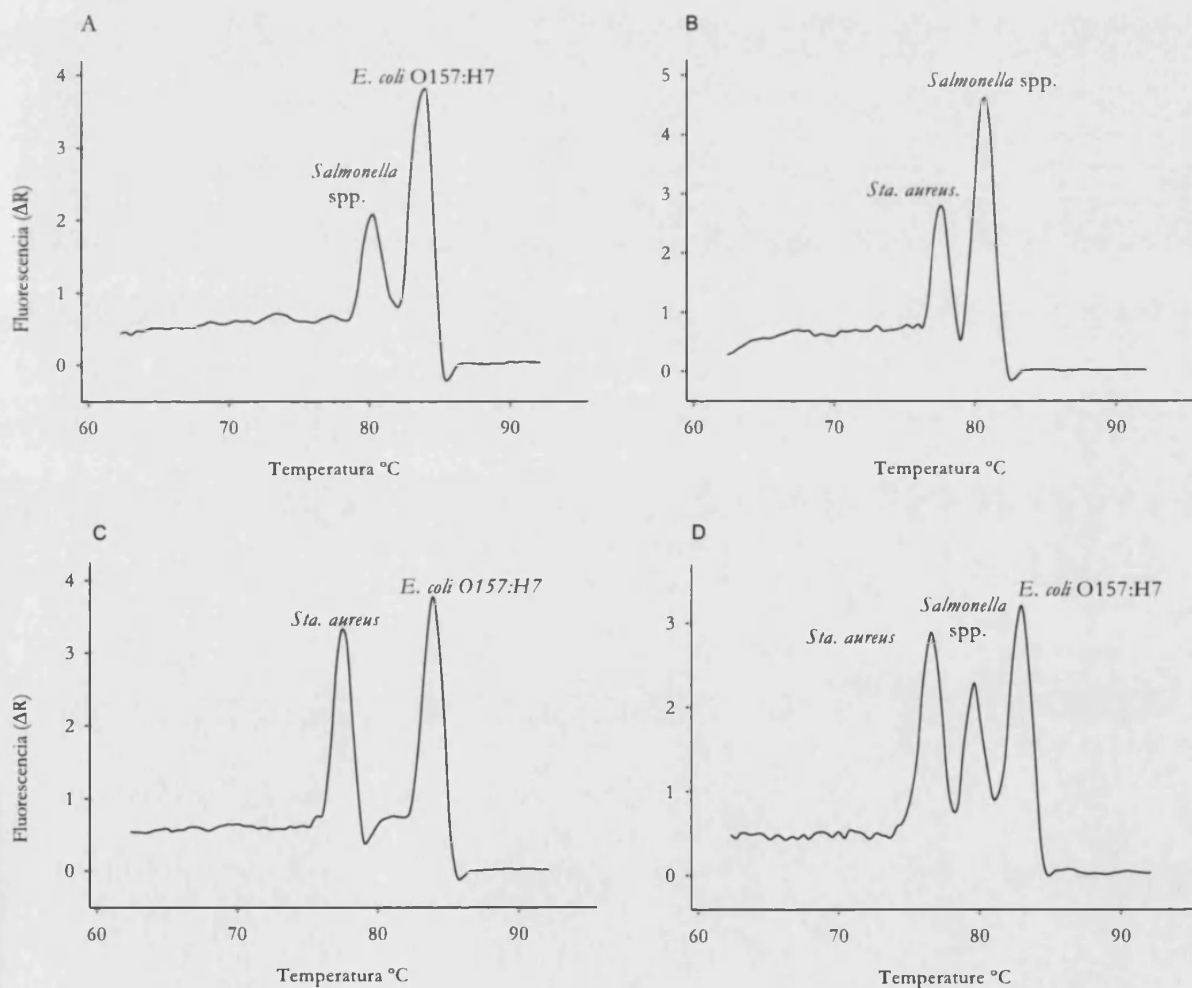


Figura 13. Curvas de disociación correspondientes a la reacción RTi-PCR múltiple con SYBR Green en presencia de 1 ng de DNA de A) *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, B) *Sta. aureus* y *Salmonella*, C) *Sta. aureus* y *E. coli* O157:H7 y D) *Sta. aureus*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

A continuación se diseñó la reacción en modo TaqMan utilizando las sondas específicas para *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus*, marcadas en el extremo 5' con los fluoróforos NED (2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fused fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína), VIC (2'-cloro-7'-phenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína) y FAM (éster de carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimida), respectivamente. Estos fluoróforos fueron seleccionados en función de su longitud de onda de emisión máxima (VIC, 554 nm; FAM, 518 nm; NED, 575 nm) y de las características del equipo de RTi-PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System) para reducir el solapamiento de los espectros. Todas las sondas se marcaron en el extremo 3' con silenciadores no fluorescentes ("dark quencher") con el fin de que la fluorescencia obtenida a lo largo de toda la reacción procediera únicamente de los fluoróforos asociados a cada una de las sondas. Tras las distintas pruebas para optimizar la reacción, la temperatura óptima de hibridación para los tres pares de cebadores y las tres sondas se estableció en 63 °C. La concentración de cada una de las sondas se mantuvo a 50 nM el nivel más bajo para el cual se obtenía un buen rendimiento en la amplificación y no se observaban interferencias entre ellas. La concentración de los cebadores (100 nM para los cebadores de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. y 300 nM para los de *Sta. aureus*) así como la de MgCl₂ (3,5 mM) no se modificaron con respecto a las optimizadas en modo SYBR Green ya que el rendimiento de la reacción fue bueno en estas condiciones.

3.3 Comparación RTi-PCR múltiple-simple

Una vez optimizadas las condiciones de la reacción múltiple, se comprobó su sensibilidad comparando los resultados con los obtenidos para las reacciones de RTi-PCR simples correspondientes. Para ello se utilizaron cantidades idénticas de DNA purificado de los tres patógenos a partir de diluciones decimales seriadas de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *Sta. aureus* CECT 86^T y *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T, cubriendo un rango de cinco órdenes logarítmicos, entre 1 y 10⁴ eg/reacción. Se realizaron en paralelo, las reacciones múltiples conteniendo la mezcla de los tres patógenos, y las simples para cada uno de los patógenos, comparándose los valores de C_T obtenidos en cada caso. Estos resultados quedan recogidos en la Tabla 31.

Tabla 31. Valores de C_T obtenidos mediante RTi-PCR simple (S) y múltiple (M) para distintas concentraciones de los tres patógenos.

Patógeno		Equivalentes genómicos/reacción				
		10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
<i>E. coli</i> O157:H7	S	24,55±2,55	32,04±2,24	32,62±1,99	35,02±0,8	39,2±1,9
	M	27,96±0,03	31,02±0,56	33,74±2,52	35,72±1,9	40±0 ^c
<i>S. enterica</i>	S	21,59±1,59	25,11±1,58	28,47±2,46	32,19±0,81	38,9±2,6
	M	25,95±0,21	30,78±0,66	35,19±2,31	37,33±1,69	40±0
<i>Sta. aureus</i>	S	25,05±1,23	28,88±1,48	32,27±1,47	35,19±1,63	38,3±1,2
	M	25,02±0,74	28,96±0,41	32,02±0,24	34,64±0,77	40±0

C_T ≥ 40, resultado negativo.

Para *Sta. aureus*, los valores de C_T fueron similares en RTi-PCR múltiple y simple. En el caso de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp., los valores de C_T de la RTi-PCR múltiple fueron, en todos los casos, más

altos que los de la simple, posiblemente debido a que en el desarrollo de la amplificación múltiple, todos los cebadores y las sondas compiten por una cantidad limitada de componentes de la reacción (dNTPs, MgCl₂, Taq polimerasa...). Para la menor cantidad de DNA analizada (1 µg/reacción) se obtuvo amplificación de los tres patógenos utilizando la reacción simple pero no con la múltiple. Estos resultados indican una ligera disminución en la sensibilidad de la reacción, que afecta a la detección en las concentraciones más bajas, cuando se utilizan todos los cebadores y las sondas, simultáneamente.

3.4 Aplicación de la RTi-PCR múltiple en alimentos inoculados

3.4.1 Amplificación a partir de concentraciones iguales de los tres patógenos

Se ensayó en dos tipos de lechuga (Redina y lechuga Romana) que se inocularon con diluciones decimales seriadas de cultivos de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *S. enteritidis* spp. *enteritidis* CECT 915^T y *Sta. aureus* CECT 86^T cubriendo un rango entre 10² y 10⁷ ufc/g de cada cepa, en las mismas cantidades. Una muestra sin inocular de cada tipo de lechuga se mantuvo durante todo el proceso como control negativo para garantizar la ausencia de los patógenos en estudio en el alimento a inocular. El DNA se extrajo mediante el método DNeasy Tissue Kit y se amplificó por RTi-PCR múltiple, en triplicado, para cada concentración. En todos los casos, se observó la amplificación de los tres patógenos en el control externo garantizando así la ausencia de inhibidores de la reacción en ambas matrices. El límite de detección, estimado como la dilución más alta a partir de la que se obtiene amplificación, se determinó a partir de dos experimentos de inoculación independientes. Para la RTi-PCR

múltiple con SYBR Green se estableció en 9 ufc/reacción para *E. coli* O157:H7, 18 ufc/reacción para *Salmonella*, y en 5 ufc/reacción para *Sta. aureus*. Estos valores corresponden a 10^4 ufc/g para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, y 10^3 ufc/g para *Sta. aureus*. Utilizando la RTi-PCR múltiple en modo TaqMan, el límite de detección para *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 mejoró en un orden logarítmico estableciéndose en 10^3 ufc/g para los tres patógenos.

3.4.2 Amplificación a partir de DNA o células de los tres patógenos en distintas concentraciones

Con el fin de evaluar de forma más fina la sensibilidad de la RTi-PCR múltiple, se realizaron combinaciones de distintas cantidades de los tres patógenos, utilizando DNA purificado y cuantificado a partir de cultivos puros. Paralelamente, para valorar la sensibilidad de la técnica cuando se aplica a alimentos, se inocularon combinaciones de distintas cantidades de células de cada uno de los patógenos en muestras vegetales (espinacas y “little gem”) y el DNA se extrajo utilizando el DNeasy Tissue kit. Todas estas muestras se analizaron tanto en modo SYBR Green como TaqMan. Los resultados se muestran en la Tabla 32 a y b. En los ensayos con DNA se obtuvo la amplificación de los tres patógenos cuando se encontraban en las mismas concentraciones. Sin embargo, utilizando combinaciones de 10 y 10^4 eg/reacción, no se observaba amplificación del patógeno que se encontraba en menor cantidad mediante SYBR Green ni utilizando las sondas TaqMan. No obstante, en las combinaciones de 10 y 10^2 eg/reacción en modo SYBR Green, se observaron los picos de T_m correspondientes a los tres patógenos y

también se observó señal de amplificación a la longitud de onda de las tres sondas cuando se utilizaba el sistema TaqMan, indicando que en estas cantidades los tres patógenos son detectados por la RTi-PCR múltiple.

Respecto a los ensayos de inoculación en muestras vegetales, se utilizaron espinacas y lechuga “little gem” previamente analizadas durante el desarrollo de este trabajo y que resultaron negativas para la presencia de los tres patógenos. La carga microbiana endógena de estas muestras, estimada por recuento en placa fue de 2×10^4 y 3×10^4 ufc/g para la lechuga “little gem” y las espinacas, respectivamente. Tras el correspondiente enriquecimiento y la extracción mediante DNeasy Tissue Kit, se analizaron mediante PCR. En ambos casos se obtuvieron resultados negativos para las tres PCRs específicas indicando así la ausencia de los patógenos previamente a la inoculación. El control externo de amplificación rindió resultados positivos para los tres patógenos, en los dos vegetales, garantizando la ausencia de inhibidores de la reacción en las dos matrices utilizadas.

En las combinaciones de 10 y 10^4 eg/reacción (Tabla 32a), los resultados fueron idénticos a los obtenidos a partir del DNA purificado y no se observó señal para el patógeno que se encontraba en menor cantidad, por ninguno de los dos métodos (SYBR Green y TaqMan). Cuando se utilizaron combinaciones de 10 y 10^2 céls/reacción se observó amplificación mediante el sistema TaqMan en todas las combinaciones. Sin embargo, se obtuvieron valores de C_T superiores a 39, en algunos casos, para los patógenos que se encontraban en menor cantidad (Tabla 32b). Del mismo modo, utilizando el sistema SYBR Green, el análisis de

Tm mostraba que, en muchos casos, el pico correspondiente al patógeno que se encontraba en menor concentración era el más bajo.

En el primer experimento de inoculación (Tabla 32a) el sistema TaqMan no detectó *E. coli* O157:H7 cuando los tres patógenos se encontraban a la concentración más baja (10 céls/reacción). Sin embargo, en el segundo experimento de inoculación, en estas mismas concentraciones, los tres patógenos fueron detectados tanto por SYBR Green como por TaqMan (Tabla 32b). Estos resultados pueden deberse a la distribución aleatoria de los microorganismos en la suspensión. Como consecuencia, las alícuotas que se tomen de una suspensión no necesariamente contienen siempre la misma cantidad de células. Por esta razón, las diluciones correspondientes a 10 céls/reacción pueden contener un rango de entre 0 y 10 células lo que explica que, en algún caso, al tomar la alícuota para la PCR esta no contenga ninguna célula.

Tabla 32. Co-amplificación de *S. enterica* ssp. *enterica* CECT 915^T, *Sta. aureus* CECT 86^T y *E. coli* O157:H7 CECT 4267 presentes en diferentes niveles a partir de DNA purificado y muestras vegetales inoculadas.

a) Combinaciones de 10 y 10⁴ equivalentes genómicos ó 10 y 10⁴ células/reacción^a.

	Inoculo			SYBR Green I			TaqMan		
	Sal.	Sta.	E.	Sal	Sta	E	Sal.	Sta.	E.
Espinacas	10	10	10	+	+	+	31,04 ± 1,03	28,55 ± 0,52	40 ^b
	10	10	10 ⁴	+	+	+	27,13 ± 0,31	29,52 ± 0,33	20,84 ± 0,53
	10	10 ⁴	10	-	+	-	40	20,85 ± 0,12	40
	10 ⁴	10	10	+	-	-	19,85 ± 1,13	40	40
	10	10 ⁴	10 ⁴	-	+	+	40	19,05 ± 0,61	24,94 ± 0,63
	10 ⁴	10 ⁴	10	+	+	-	17,79 ± 0,12	17,32 ± 0,02	40
	10 ⁴	10	10 ⁴	+	-	+	18,36 ± 0,30	40	23,33 ± 1,12
	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	+	+	+	18,76 ± 1,00	18,18 ± 0,22	23,42 ± 1,82
"Little Gem"	10	10	10	+	+	+	28,77 ± 0,72	31,03 ± 0,54	40 ^b
	10	10	10 ⁴	+	+	+	29,82 ± 6,11	25,22 ± 1,11	19,78 ± 0,93
	10	10 ⁴	10	-	+	-	40	19,52 ± 0,14	40
	10 ⁴	10	10	+	-	-	17,78 ± 0,12	40	40
	10	10 ⁴	10 ⁴	-	+	+	40	17,02 ± 0,14	20,58 ± 0,14
	10 ⁴	10 ⁴	10	+	+	-	16,89 ± 0,22	17,25 ± 0,23	40
	10 ⁴	10	10 ⁴	+	-	+	17,61 ± 0,21	40	23,84 ± 0,56
	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	+	+	+	18,13 ± 0,13	18,23 ± 0,04	25,6 ± 1,04
DNA	10	10	10	+	+	+	26,33 ± 0,65	30,12 ± 0,51	30,99 ± 0,32
	10	10	10 ⁴	+	+	+	29,02 ± 1,20	24,21 ± 0,23	17,34 ± 0,86
	10	10 ⁴	10	-	+	-	40	17,23 ± 0,13	40
	10 ⁴	10	10	+	-	-	16,61 ± 0,34	40	40
	10	10 ⁴	10 ⁴	-	+	+	40	16,11 ± 0,35	18,98 ± 0,26
	10 ⁴	10 ⁴	10	+	+	-	15,93 ± 0,35	16,24 ± 0,42	40
	10 ⁴	10	10 ⁴	+	-	+	16,33 ± 0,21	40	21,32 ± 0,74
	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	+	+	+	16,16 ± 0,34	16,21 ± 0,33	27,64 ± 1,31

^aCorresponde a 6,1x10³ y 6,1x10⁶ ufc/g para *Salmonella*; 7,9x10³ y 7,9x10⁶ ufc/g para *E. coli*; 3,4x10³ y 3,4x10⁶ ufc/g para *Sta. aureus*.

^bResultados negativos por TaqMan pero positivos por SYBR Green I.

Tabla 32. (Continuación)

b) Combinaciones de 10 y 10² equivalentes genómicos y 10 y 10² células/reacción^c.

	Inoculo			SYBR Green I			TaqMan		
	Sal.	Sta.	E.	Sal	Sta	E.	Sal.	Sta.	E.
Espinacas	10	10	10	+	+	+	30,04 ± 1,63	31,54 ± 0,55	32,43 ± 1,08
	10	10	10 ²	d	d	+	39,17 ± 0,68 ^d	36,66 ± 0,04	25,35 ± 0,08
	10	10 ²	10	d	+	d	31,59 ± 0,99	23,24 ± 0,04	36,71 ± 3,12
	10 ²	10	10	+	+	+	25,89 ± 0,51	38,64 ± 0,15	39,96 ± 0,12 ^d
	10	10 ²	10 ²	d	+	+	39,24 ± 0,25 ^d	24,42 ± 0,12	23,94 ± 0,61
	10 ²	10 ²	10	+	+	+	27,21 ± 0,98	23,99 ± 0,15	39,81 ± 0,20 ^d
	10 ²	10	10 ²	+	+	+	21,36 ± 0,31	38,56 ± 0,29	23,32 ± 1,15
	10 ²	10 ²	10 ²	+	+	+	30,06 ± 1,21	25,67 ± 1,21	26,79 ± 0,38
	10 ³	10 ³	10 ³	+	+	+	27,13 ± 0,35	27,51 ± 1,32	25,84 ± 1,05
	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	+	+	+	24,21 ± 0,95	20,75 ± 0,12	22,08 ± 1,23
DNA	10	10	10	+	+	+	37,50 ± 0,99	29,57 ± 0,01	36,69 ± 0,13
	10	10	10 ²	+	+	+	33,79 ± 0,89	29,63 ± 0,02	26,56 ± 0,32
	10	10 ²	10	+	+	+	37,48 ± 1,91	25,89 ± 0,45	35,15 ± 1,10
	10 ²	10	10	+	+	+	20,04 ± 0,06	29,71 ± 0,26	35,56 ± 0,03
	10	10 ²	10 ²	+	+	+	38,39 ± 0,10	26,29 ± 0,13	28,39 ± 1,16
	10 ²	10 ²	10	+	+	+	29,04 ± 1,19	23,53 ± 0,14	36,22 ± 1,83
	10 ²	10	10 ²	+	+	+	31,06 ± 0,07	31,17 ± 0,96	19,98 ± 0,82
	10 ²	10 ²	10 ²	+	+	+	31,33 ± 0,54	26,25 ± 0,00	33,00 ± 0,45
	10 ³	10 ³	10 ³	+	+	+	26,62 ± 0,00	23,62 ± 0,05	22,80 ± 0,12
	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	+	+	+	21,14 ± 0,12	19,77 ± 0,64	21,53 ± 0,64

d, pico débil a la correspondiente T_m.

^cCorresponde a 5,1x10³ y 5,1x10⁴ ufc/g para *Salmonella*; 4,2x10³ y 4,2x10⁴ ufc/g para *E. coli*; 7,8x10³ y 7,8x10⁴ ufc/g para *Sta. aureus*.

^d Resultados considerados negativos debido a que los valores de C_T son muy cercanos a 40.

3.4.3 Detección tras enriquecimiento

Los niveles de detección alcanzados por la RTi-PCR múltiple en muestras sin enriquecer (10² céls/g), no permiten garantizar la ausencia de *E. coli* O157:H7 y/o *Salmonella* en 25 g, tal y como rige la legislación vigente. Para solventar esto, tres muestras vegetales (brócoli, espinacas y lechuga “little gem”) se homogeneizaron con 225 ml de APT y se inocularon con 1, 10 o 10² ufc/25 g de cada uno de los patógenos,

incubándose a 37 °C. Paralelamente se realizaron recuentos en placa de los cultivos para determinar la cantidad real inoculada.

Se tomaron alícuotas de 1 ml, a las 6 y a las 24 h, que se analizaron por RTi-PCR múltiple, tanto en modo SYBR Green como TaqMan. En la Tabla 33 se muestran los resultados correspondientes a las 6 h de enriquecimiento. En todos los casos se obtuvo amplificación en presencia de 10 y 100 ufc/25 g. Para las muestras inoculadas con 1 ufc/25 g no se obtuvo señal en el caso de *E. coli* O157:H7 en espinacas, ni para *Salmonella* en espinacas y lechuga “little gem”. Las muestras negativas se analizaron también tras las 24 h de incubación repitiéndose el resultado. En ambos casos el recuento en placa reveló que el inóculo inicial era de aproximadamente 1 ufc/25 g por lo que el resultado positivo para brócoli y negativo para espinacas y lechuga “little gem” se explicaría por la ausencia de estos microorganismos en la alícuota analizada, debido a su distribución aleatoria en el tubo.

Tabla 33. Detección de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus* por RTi-PCR múltiple en vegetales inoculados, tras 6 h de enriquecimiento en APT.

	Inoculo inicial (ufc/25g)	SYBR Green			TaqMan		
		Bróc.	Espin.	LG	Brócoli	Espinacas	LG
<i>E. coli</i> O157:H7	1,04	+	-	+	33,80 ± 1,41	---	36,03 ± 5,03
	10,4	+	+	+	27,40 ± 2,80	28,50 ± 0,81	27,70 ± 2,08
	104	+	+	+	24,62 ± 1,20	27,39 ± 1,62	22,08 ± 1,20
<i>Salmonella</i>	0,97	+	-	-	37,35 ± 0,71	---	---
	9,7	+	+	+	29,47 ± 0,62	36,03 ± 5,03	30,14 ± 0,22
	97	+	+	+	33,33 ± 0,90	30,26 ± 2,30	28,97 ± 0,02
<i>Sta. aureus</i>	1,69	+	+	+	23,62 ± 0,21	22,90 ± 0,17	25,08 ± 0,18
	16,9	+	+	+	18,95 ± 0,08	18,88 ± 0,05	19,00 ± 0,12
	169	+	+	+	18,96 ± 0,24	18,80 ± 0,30	18,93 ± 0,25

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El aumento en la demanda de productos listos para el consumo ha llevado al desarrollo de la automatización en el procesado de los alimentos incrementándose el riesgo de contaminación (Nugen y Baeumner, 2008). Uno de los factores que contribuye de manera notable a este incremento es el hecho de que los productos preparados sufren una serie de procesos de corte y manipulación que generan las condiciones adecuadas para la proliferación de patógenos (Heaton y Jones, 2007). La detección y cuantificación de microorganismos patógenos en alimentos es uno de los grandes retos a los que se enfrenta la industria alimentaria actualmente. La mejora de la seguridad tanto de los alimentos como del agua de consumo, depende de la posibilidad de detectar, identificar y realizar un seguimiento de los posibles patógenos presentes en estos productos (Palchetti y Malscini, 2008). Por tanto, la aplicación de controles microbiológicos a lo largo de toda la cadena de procesado es imprescindible para minimizar riesgos y garantizar la calidad y seguridad del producto final.

Los métodos tradicionales para la detección de patógenos en alimentos se basan en el aislamiento e identificación de colonias en medios selectivos lo que, en el caso de los patógenos, requiere de pasos de pre-enriquecimiento, enriquecimiento y confirmación bioquímica siendo el proceso largo y, en ocasiones, no concluyente. La necesidad de desarrollar metodologías para la detección rápida, identificación y cuantificación de estos microorganismos, ha sido el objetivo de un gran número de científicos. Este hecho se ha visto reflejado en la publicación, en los últimos 20 años, de más de 2.000 artículos de investigación sobre

la detección de patógenos, de los cuales un 38 % están relacionados con la seguridad alimentaria (Lazcka *et al.*, 2007). Como resultado se han desarrollado nuevas técnicas para la detección rápida y sensible de patógenos en alimentos entre las que destacan los métodos inmunológicos y los de PCR (Kumar *et al.*, 2008). Entre los primeros, el VIDAS® (Vitek Inmuno Diagnostic Assay System, Biomerieux) es uno de los más utilizados por las empresas de alimentos por su facilidad de ensayo. En cuanto a las técnicas de PCR, constituyen una buena alternativa para la detección de patógenos en alimentos por su rapidez, sensibilidad y precisión (Hoorfar *et al.*, 2004). En el caso de la RTi-PCR, a estas ventajas se suman la posibilidad de cuantificar los microorganismos presentes en la muestra y la automatización del proceso, que permite procesar un número elevado de muestras, reduciendo los problemas de contaminaciones posteriores (Malorny *et al.*, 2008). No obstante, su aplicación rutinaria en el análisis de alimentos es todavía escasa debido, por un lado, a su reciente incorporación en normas ISO y por otro, a la falta de resultados de validación en muestras de contaminación natural, y a las limitaciones de la técnica como son la presencia de inhibidores en las distintas matrices alimentarias, los niveles reales de detección de estos procedimientos o las posibles interferencias que la presencia de células muertas pueda ocasionar.

En este trabajo se ha abordado la aplicación de la RTi-PCR, en distintas variantes, para la detección de patógenos, evaluándose así mismo su utilidad como prueba diagnóstica en el control microbiológico de alimentos. Se ha centrado en *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus*, cuatro de los patógenos que habitualmente se

investigan en alimentos ya que son responsables de un gran número de toxiinfecciones alimentarias. Todos ellos preocupan de gran manera a la industria alimentaria debido a su alta incidencia y/o la tasa de mortalidad asociada (Anon, 2007a).

En primer lugar se realizó un estudio comparativo de distintos métodos comerciales de extracción de DNA, para los cuatro patógenos, con el fin de seleccionar el más adecuado para la detección por PCR. Posteriormente, se evaluó la aplicación de la RTi-PCR para la detección directa de los cuatro patógenos en muestras naturales, comparándola con el sistema mini-VIDAS como técnica rápida ampliamente utilizada en el análisis rutinario de alimentos. La evaluación de la técnica se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos, paralelamente en dos laboratorios, para comprobar su reproducibilidad. Finalmente, se desarrolló un sistema de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp y *Sta. aureus*, en una única reacción, con el fin de conseguir un método de análisis de patógenos más rápido y económico. A continuación se discuten los resultados obtenidos para cada uno de los aspectos investigados.

1. Selección de un método de extracción para la detección por PCR de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus* en alimentos

La aplicación de las técnicas de PCR para la detección de microorganismos en alimentos está condicionada por la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción en la matriz alimentaria así como por la obtención de DNA de calidad en cuanto a integridad y pureza del

DNA recuperado (Mafra *et al.*, 2008). Estos factores dependen de la propia composición de los alimentos así como del procesado durante la cadena de producción. Así por ejemplo, la acidez característica de frutas y verduras o los tratamientos alcalinos, que se aplican a muchos tipos de alimentos preparados, degradan considerablemente el DNA (Di Bernardo *et al.*, 2007). Pero también afectan de forma considerable los parámetros físicos y químicos del método de extracción de DNA utilizado. Por todo ello, es imprescindible disponer de un método de extracción, que elimine los inhibidores de la matriz del alimento permitiendo la recuperación de los ácidos nucleicos con una calidad suficiente para la reacción de amplificación.

En este estudio, se han comparado cuatro métodos comerciales de extracción de ácidos nucleicos en cuanto a eficiencia, sensibilidad, estandarización, rapidez, rango de aplicación, facilidad de uso y coste. Dos de estos métodos incluyen la utilización de columnas de sílice y los otros dos, tratamientos térmicos de la muestra en presencia de una matriz protectora. Los cuatro métodos se evaluaron con los cuatro patógenos incluidos en el estudio, dos Gram-positivos *L. monocytogenes* y *Sta. aureus*, y dos Gram negativos *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. El estudio se centró en matrices vegetales, productos en los que se ha observado un aumento en el número de brotes de toxiinfecciones motivado por el incremento en el consumo de frutas y verduras frescas (Doyle y Erickson, 2008). Se utilizaron brócoli, pimiento verde y cebolla inoculadas con las mismas diluciones de cada uno de los patógenos.

La comparación de los cuatro métodos se llevó a cabo determinando el nivel de sensibilidad en la detección del patógeno

correspondiente mediante amplificación por PCR específica. El DNA recuperado fue amplificado en todos los casos, aunque mostrando diferente nivel de sensibilidad, excepto cuando se utilizó el método PrepMan Ultra con el que no se obtuvo amplificación para *Sta. aureus*, en pimiento verde y brócoli, en ninguna de las concentraciones de patógeno, en dos ensayos de inoculación independientes. Sin embargo, si se obtuvo amplificación en la muestra de cebolla, por lo que el fallo de la reacción en las otras dos matrices podría estar relacionado con interacciones entre los componentes celulares de *Sta. aureus* y los compuestos fenólicos y orgánicos propios de estos vegetales.

Los estudios reportados en la bibliografía sobre comparación de métodos de extracción de DNA, incluyendo el PrepMan Ultra, apoyan nuestros resultados. Así, Li y Mustapha (2002) lo compararon con dos métodos de purificación en columna y con el calentamiento directo de la muestra, para la detección de *Salmonella* por PCR en carne de ternera y cerdo. Heller *et al.* (2003) lo compararon con dos métodos de extracción basados en matrices magnéticas y con un tercero que utiliza una columna de purificación para *E. coli* O157:H7 a partir de muestras de pan, ensaladas, salsas y ternera. En ambos casos, observaron diferencias muy ligeras entre ellos y concluyeron que PrepMan Ultra era el óptimo por tratarse de un método sencillo y rápido. Sin embargo, Park *et al.* (2006) compararon PrepMan Ultra y DNeasy Tissue Kit para la extracción simultánea de DNA de *Y. enterocolitica*, *Sta. aureus* y *Shigella* spp., a partir de muestras de lechuga, y obtuvieron productos de PCR más claros y definidos con el segundo, para los tres patógenos. Coincidiendo con éste último trabajo, en el presente estudio, DNeasy Tissue Kit rindió la

sensibilidad más alta en las tres matrices ensayadas para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* y, en cebolla y brócoli para *Sta. aureus*, siendo por tanto el mejor método de extracción para todos los patógenos y matrices ensayadas.

El análisis estadístico de los límites de detección obtenidos para los tres patógenos (excluyendo *Sta. aureus*), considerando los efectos ejercidos por la matriz y el patógeno, demostró que existen diferencias significativas entre los cuatro métodos comparados. Así mismo, cuando se consideraron independientemente ambos factores, el análisis de varianza reveló que el método de extracción se ve afectado significativamente tanto por el patógeno como por la matriz en la que se encuentra. Al comparar los cuatro métodos, considerando los efectos de la matriz y del patógeno globalmente, DNeasy Tissue Kit fue el único que presentaba diferencias significativas con respecto a los demás, confirmando lo observado a simple vista.

Así mismo, en estudios previos del grupo de investigación, DNeasy Tissue kit resultó al menos igual de sensible que el método descrito por Pitcher *et al.* (1989) al compararlo para la detección por PCR de *L. monocytogenes* en muestras de carne de vacuno (Aznar y Alarcón, 2003). En ese mismo estudio, DNeasy Tissue kit resultó más sensible que otros métodos comerciales basados en la purificación del DNA a través de columnas cromatográficas. Además, ha sido aplicado con éxito en otros estudios del grupo de investigación para la detección por PCR de *L. monocytogenes* y *Sta. aureus* en una amplia variedad de matrices alimentarias incluyendo productos cárnicos, lácteos, alimentos listos para el consumo y pescados (Aznar y Alarcón, 2003; Alarcón *et al.*, 2006).

Los métodos que emplean columnas de sílice como son el DNeasy Tissue Kit (Qiagen) y el UltraClean DNA purification kit (MoBio) se basan en la unión del DNA al sílice contenido en la columna, en presencia de altas concentraciones de sales y etanol. Estas condiciones estabilizan el DNA y permiten una mejor eliminación de otros componentes celulares (Hoff-Olsen *et al.*, 1999), así como de restos de la matriz del alimento que podrían actuar como inhibidores de la reacción de PCR (Barken *et al.*, 2007). Estos métodos presentan como principales inconvenientes, que resultan más caros y, además, requieren de una mayor manipulación para la purificación del DNA. Por el contrario, los métodos basados en tratamientos térmicos como InstaGene Matrix (BioRad) o PrepMan Ultra (AppliedBiosystems) son más económicos pero el DNA obtenido tras la extracción es más inestable y puede presentar mayor cantidad de residuos sólidos que interferirán en la reacción de PCR. Por ello, este tipo de métodos son más adecuados para muestras con poca cantidad de residuos sólidos como aguas (Merk *et al.*, 2001).

Todos estos factores deben considerarse para establecer un método de extracción de DNA robusto que permita su aplicación para la detección por PCR de diversos patógenos en matrices alimentarias variadas, asegurando la especificidad y sensibilidad (Liu, 2008). En este sentido, los resultados del presente estudio confirman, por un lado la eficacia del DNeasy Tissue kit para la extracción de DNA de *Sta. aureus* y *L. monocytogenes* (Alarcón *et al.*, 2006; Aznar y Alarcón, 2003), ampliando las matrices alimentarias ensayadas a vegetales frescos, y por otro su

eficacia para la extracción de DNA de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en alimentos vegetales.

2. Evaluación de la RTi-PCR para la detección directa y la cuantificación de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus* en alimentos

La industria alimentaria requiere de métodos rápidos y sensibles que permitan el análisis simultáneo de un gran número de muestras para el análisis rutinario de alimentos con el objetivo de garantizar la seguridad de sus productos y ajustarse a los criterios microbiológicos contemplados en las normas ISO (internacionales), CEN (europeas), AOAC (norteamericanas), AENOR (españolas), etc. Como se ha expuesto anteriormente, el VIDAS® (Vitek Inmuno Diagnostic Assay System, Biomerieux) es un método establecido como rápido y de rutina, por su facilidad de ensayo, y que ha sido adoptado por la AOAC (“Association of Oficial Analytical Chemists”). Estudios recientes demuestran que su sensibilidad y especificidad pueden verse comprometidas dependiendo tanto del patógeno investigado como del alimento en el que se encuentra (Aznar y Solís, 2006; Eriksson y Aspan, 2007; Vaz-Velho *et al.*, 2001). Como alternativa, la automatización en la detección por PCR, utilizando los equipos de RTi-PCR, favorecerá la incorporación de esta metodología como técnica rutinaria en el análisis de alimentos. Sin embargo, se cuestionan sus ventajas en la detección de patógenos en alimentos en cuanto a que puede detectar células muertas y a que su sensibilidad está limitada por el tamaño de la muestra que finalmente se analiza en el tubo de reacción (Maurer, 2006). Estas

limitaciones se han abordado introduciendo un paso de enriquecimiento previo a la detección por PCR, lo que permite el crecimiento de las células vivas y la recuperación de las células dañadas, aumentando su número y, en consecuencia la sensibilidad en la detección (Schaad *et al.*, 1995). Por otro lado, en estudios previos en los que se comparó la detección por PCR y por RTi-PCR, observamos que con esta última aumentaba el nivel de sensibilidad en al menos una unidad logarítmica (Alarcón *et al.*, 2006). Aunque el proceso de amplificación es fundamentalmente el mismo, el sistema de detección empleado en la RTi-PCR es más sensible que la electroforesis en gel, habitualmente utilizada tras la PCR convencional. Con estos antecedentes, en este trabajo se ha evaluado la RTi-PCR como prueba diagnóstica para la detección de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp, *Sta. aureus* y *L. monocytogenes* en el análisis rutinario de alimentos.

En primer lugar, se comenzó con la selección de cebadores específicos entre los publicados en la bibliografía para *E. coli* O157:H7 (Jinneman *et al.*, 2003), *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2004), *Sta. aureus* (Alarcón *et al.*, 2006) y *L. monocytogenes* (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004a). Al reproducir las condiciones de reacción publicadas encontramos que, en algunos casos, no se obtenía amplificación o que la especificidad no era la esperada y, en otros, hubo que ajustar las condiciones para optimizar el rendimiento. Así en el caso de los cebadores ttr4/ttr6, publicados por Malorny *et al.* (2004) como específicos para *Salmonella* spp., se obtuvo amplificación en las cuatro cepas de *E. coli* incluidas en el estudio. En la publicación se garantizaba la especificidad tras haber sido ensayadas en 87 cepas de 16 géneros distintos, incluyendo 15 cepas de *E.*

coli. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de comprobar la especificidad de los cebadores seleccionados de la bibliografía bajo las condiciones de cada laboratorio. Por tanto, se ensayó un nuevo par de cebadores y sonda para *Salmonella* spp. (Hoorfar *et al.*, 2000) que probaron ser específicos por PCR convencional y, tras algunas modificaciones, también por RTi-PCR.

Tras comprobar la especificidad del total de cebadores, se construyeron las curvas estándar a partir de DNA purificado y de suspensiones celulares, y se establecieron los límites de detección en 10^{-1} eg/reacción o 1 cél/reacción para *Salmonella*, *Sta. aureus* y *L. monocytogenes* y en 1 eg/reacción o 10 céls/reacción para *E. coli* O157:H7. Los ensayos en muestras inoculadas revelaron un límite de cuantificación y detección de 10^2 ufc/g, en los cuatro patógenos, corroborando los niveles establecidos con cultivos puros y demostrando su utilidad para el análisis en alimentos.

Los niveles de detección obtenidos en este estudio, combinando la extracción de DNA con DNeasy Tissue Kit y la RTi-PCR, igualan e incluso mejoran los previamente publicados en la bibliografía para patógenos alimentarios. Así pues, se encuentran en el mismo rango que los obtenidos por RTi-PCR para patógenos como *Sta. aureus* en carne (Alarcón *et al.*, 2006) y en queso (Hein *et al.*, 2001) inoculados artificialmente, utilizando el DNeasy Tissue Kit y el método de Allman *et al.*, (1995), respectivamente; *B. cereus* en pasta y arroz utilizando el AquaPure genomic DNA isolation kit (Bio-Rad) y el NucleoSpin food kit (Macherey-Nagel) (Fricker *et al.*, 2007) o *L. monocytogenes* en leche desnatada con el Dynabead DNA Direct (Dyna) (Nogva *et al.*, 2000).

Mejoran los resultados de Seo *et al.*, (2006) que establecieron el límite de cuantificación en 10^3 ufc/g para *Salmonella* spp. en helado casero, tras extracción de ácidos nucleicos mediante PrepMan Ultra. También Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004b) obtuvieron un límite de cuantificación más alto (10^3 ufc/g) para *L. monocytogenes*, en ensayos realizados a partir de productos cárnicos, utilizando los mismos cebadores de este estudio, y empleando el método Wizard genomic DNA purification Kit (Promega) para la extracción del DNA.

A continuación se evaluó la RTi-PCR como prueba diagnóstica para la detección de estos patógenos directamente mediante su aplicación en 316 alimentos de contaminación natural, en dos laboratorios. Se compararon los resultados con los obtenidos por PCR convencional tras el enriquecimiento, y con los del método mini-VIDAS (bioMerieux) para *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. monocytogenes*. En el caso de *Sta. aureus*, no existe la versión de mini-VIDAS para la detección de este microorganismo por lo que la comparación se hizo con el método tradicional de cultivo. El índice kappa demostró que el grado de acuerdo entre los resultados de ambos laboratorios era “muy bueno o perfecto” para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella*, confirmando, por tanto, la reproducibilidad de la PCR y de la RTi-PCR. El acuerdo entre los resultados de PCR convencional de ambos laboratorios para *Sta. aureus* fue moderado, lo que podría estar condicionado por el menor número de muestras analizadas para este patógeno.

La detección por PCR convencional tras enriquecimiento se realizó para evitar falsos negativos y/o positivos por la incapacidad de la PCR para diferenciar entre células vivas y muertas (Rudi *et al.*, 2005).

Asumiendo que el paso de cultivo previo a la PCR, permitiría el crecimiento de las células viables aumentando su número, de este modo se favorece la detección de los niveles más bajos y se reduce la posibilidad tanto de falsos negativos como de falsos positivos. Con estas premisas, los resultados obtenidos mediante PCR convencional, tras enriquecimiento, se establecieron como “positivos reales o verdaderos positivos” para las posteriores comparaciones.

Al comparar los resultados de detección por RTi-PCR con los de mini-VIDAS se observó, tanto para *Salmonella* como para *E. coli* O157:H7 que la RTi-PCR detecta un mayor número de muestras positivas que el mini-VIDAS (21 % y 20 % por RTi-PCR y 1 % y 8 % por mini-VIDAS, respectivamente). Estadísticamente, estos valores se reflejan en que, aunque ambas técnicas presentan gran especificidad, el mini-VIDAS muestra menor “sensibilidad” y “seguridad” que la RTi-PCR directa en ambos casos. Cabe destacar que aunque no tenemos constancia de trabajos similares en los que se utilice la RTi-PCR directamente, sin enriquecimiento, nuestros resultados apoyan los de otros autores que realizan un paso de enriquecimiento previo a la RTi-PCR. Así por ejemplo, Kumar *et al.* (2008) encontraron un 31,6 % de positivos mediante PCR y un 23,7 % con el ensayo ELISA, para la detección de *Salmonella*, en muestras naturales de pescados y mariscos. Por su parte, Stefan *et al.* (2007) demostraron que la RTi-PCR presentaba mayor sensibilidad que el sistema VIDAS en la detección de *E. coli* O157:H7 en muestras de carne picada, tanto naturales como inoculadas artificialmente. En el caso de *L. monocytogenes*, las diferencias en detección de muestras positivas entre la RTi-PCR y el sistema mini-VIDAS no

fueron demasiado acusadas (86 % y 82 %, respectivamente). Sin embargo, los valores predictivos, positivo y negativo, fueron inferiores para el mini-VIDAS que, además, mostró una sensibilidad menor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para *L. monocytogenes* en un estudio previo (Aznar y Solís, 2006) en el que la PCR demostró ser más sensible que el mini-VIDAS, tras ensayar ambos métodos en una gran variedad de alimentos de contaminación natural.

Al realizar un análisis pormenorizado de los positivos y negativos, y dado que tomamos como “positivos conocidos” los de PCR convencional tras enriquecimiento, observamos que el mini-VIDAS rinde un gran número de falsos negativos. Cabe señalar que en mini-VIDAS, el resultado positivo por inmunoensayo debe confirmarse mediante aislamiento e identificación del patógeno a partir del enriquecimiento. En estas placas de aislamiento es frecuente que el crecimiento excesivo de la microbiota acompañante enmascare la presencia del patógeno dificultando su recuperación (Aznar y Solís, 2006). A este respecto, las técnicas de PCR aportan una mayor sensibilidad porque son capaces de detectar los patógenos en poblaciones mixtas sin necesidad de aislarlos previamente. Por otro lado, también son frecuentes los falsos positivos por mini-VIDAS como ha sido demostrado en trabajos previos (Aznar y Solís, 2006), probablemente debido a reacciones inmunológicas cruzadas.

Considerando el total de muestras analizadas para los tres patógenos ensayados por mini-VIDAS, el número de resultados positivos mediante RTi-PCR (19,6 % en el Lab 1 y 19,9 % en el Lab 2) fue mayor que con mini-VIDAS (9,8 %). El análisis estadístico global de

los resultados obtenidos para los tres patógenos reveló la alta especificidad tanto de la RTi-PCR como del mini-VIDAS. Sin embargo, en cuanto a “sensibilidad” y “seguridad”, la RTi-PCR se comporta mejor como prueba diagnóstica que el mini-VIDAS, aún asumiendo que su aplicación directa, sin enriquecimiento, estará ofreciendo un resultado sesgado con posibles “falsos negativos”. Así mismo, en el caso de *Sta. aureus* los resultados de detección por RTi-PCR mejoran los obtenidos por el método ISO 6888. No obstante, en este caso, las diferencias son menos notables. Aunque ambas técnicas resultan muy específicas, la RTi-PCR es ligeramente superior en cuanto a “sensibilidad” y “seguridad”.

Además, la aplicación directa de la RTi-PCR sin enriquecimiento, ha permitido cuantificar los niveles en los que se presentan estos patógenos de modo natural en alimentos. Los resultados obtenidos en ambos laboratorios no presentaron diferencias significativas, lo que indica una buena reproducibilidad de la técnica, y apoyan los niveles de patógenos encontrados ya que no tenemos conocimiento de estudios similares para su comparación. Así en este estudio se ha revelado que *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* se encuentran en niveles más elevados (10^3 - 10^4 ufc/g), mientras que *L. monocytogenes* predomina en niveles de 10^2 y *Sta. aureus* de 10 ufc/g o inferiores. De forma global, considerando los resultados de cuantificación de los cuatro patógenos, en el 33 % de las muestras se encuentran en niveles inferiores a 10 ufc/g, es decir, por debajo del nivel de detección de la RTi-PCR.

La legislación actual exige la ausencia tanto de *Salmonella* como de *E. coli* O157:H7 en 10 ó 25 g de alimento. Así mismo, ocurre en *L. monocytogenes* en alimentos de consumo directo o en los que se pueda dar

el crecimiento del patógeno por su composición o temperatura de almacenamiento, y para *Sta. aureus* en determinadas conservas y carnes. Los límites de detección de la RTi-PCR no permiten garantizar la ausencia de ninguno de estos patógenos si no se realiza un enriquecimiento previo. No obstante, para beneficiarnos de las ventajas de la RTi-PCR como técnica rápida en el análisis rutinario de alimentos, recomendaríamos analizar la muestra mediante RTi-PCR directamente tras la homogeneización y, simultáneamente, llevar a cabo el enriquecimiento correspondiente. Tras este paso de enriquecimiento, las muestras que resultaran negativas se analizarían por PCR o RTi-PCR, para confirmar el resultado. De este modo el análisis se completaría en unas 24 horas, reduciendo la posibilidad de obtener falsos negativos. Comparado con la detección por mini-VIDAS, aún se consigue acortar el tiempo y reducir el coste del análisis, garantizando la precisión del resultado.

3. Desarrollo y validación de la reacción de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Sta. aureus* en alimentos vegetales

Para garantizar la inocuidad de los alimentos, generalmente se investiga la presencia de más de un patógeno o agente toxigénico en una misma muestra, lo que implica la utilización de múltiples protocolos de análisis, que complican, alargan y encarecen el proceso. A este respecto, la “PCR múltiple” permite la detección e incluso cuantificación (RTi-PCR) de varios patógenos simultáneamente, utilizando un volumen mínimo de reacción. Los estudios publicados en los últimos años para la

detección de patógenos en alimentos mediante RTi-PCR múltiple se han dirigido a *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en carnes (Sharma y Carlson, 2000) o *Salmonella* y *L. monocytogenes* en aguas, leche y salchichas crudas tras 6-18 horas de enriquecimiento (Jothikumar *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004); *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, y *Shigella* en carne de vacuno (Wang *et al.*, 2007). En este trabajo se ha desarrollado una nueva reacción de RTi-PCR triple, utilizando cebadores y sondas específicos, para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., y *Sta. aureus*. Con los cebadores utilizados a lo largo de este trabajo se consiguió la amplificación simultánea de *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus* a una temperatura de hibridación de 63 °C. Sin embargo, los cebadores específicos de *Salmonella* no rindieron amplificación en esas condiciones por lo que se diseñó un nuevo sistema TaqMan para *Salmonella* spp partiendo de la secuencia del origen de replicación (OriC). Se utilizó como cebador directo el descrito previamente por Widjojoatmodjo *et al.* (1991) y se diseñaron un cebador reverso y la sonda TaqMan. El sistema desarrollado demostró ser específico de *Salmonella* spp. presentando una Tm similar ($80,2 \pm 0,1$ °C) para las 22 cepas de referencia de este género y no se obtuvo señal para las cepas de otros géneros relacionados filogenéticamente o que comparten los mismos hábitats. En cuanto al límite de detección (1 cél o eg/reacción), ha demostrado ser satisfactorio para la detección de *Salmonella* en alimentos presentando resultados iguales o mejores que los obtenidos en este mismo estudio con los cebadores diseñados por Hoorfar *et al.*, (2000). La especificidad de los cebadores y las sondas utilizados para la detección de *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus* se describió en estudios previos (Jinneman *et al.*, 2003;

Yoshitomi *et al.*, 2006, Alarcón y Aznar, 2006) y había sido comprobada a lo largo de este trabajo. Así mismo se comprobó que no se producían amplificaciones cruzadas con los otros cebadores y sondas cuando se encontraban presentes en la misma reacción.

El desarrollo de una PCR múltiple requiere de una cuidada optimización de las concentraciones de cebadores, tampón de PCR, relación entre concentración de cloruro de magnesio y los desoxinucleótidos, temperaturas de hibridación, concentración de DNA y Taq Polimerasa (Markoulatos *et al.*, 2002). En este estudio, la optimización de las concentraciones de los reactivos se llevó a cabo utilizando el modo SYBR Green debido a su mayor simplicidad y a su menor coste económico. Este sistema permite la identificación de los amplicones a partir de sus T_m tras el análisis de las curvas de disociación (Wittwer *et al.*, 2001). En las reacciones simples, la presencia de un único pico indica la especificidad de la reacción. Cuando se obtiene más de un amplicón, estos pueden ser diferenciados en función de su T_m , siempre y cuando esta diferencia sea de al menos 1°C (Ririe *et al.*, 1997, Lipsky *et al.*, 2001). Mediante la reacción de RTi-PCR múltiple desarrollada en este trabajo se obtuvieron únicamente tres picos en la curva de disociación con T_m claramente diferenciadas para cada patógeno: 77°C para *Sta. aureus*, $80,3^\circ\text{C}$ para *Salmonella* spp. y $83,3^\circ\text{C}$ para *E. coli* O157:H7, confirmándose de este modo la especificidad de los tres grupos de cebadores y sondas y la ausencia de productos de amplificación inespecíficos así como de dímeros de cebadores. La reacción en modo TaqMan se diseñó utilizando sondas marcadas en el extremo 5' con los fluorocromos, FAM, VIC, NED que presentan

longitudes de onda de emisión de 518, 554 y 575 nm, respectivamente. Las tres sondas estaban a su vez marcadas en el extremo 3' con una molécula silenciadora o "dark quencher". Esta molécula emite a una longitud de onda en el infrarrojo, en lugar del ultravioleta de los fluorocromos, por lo que permite reducir la interferencia causada por la fluorescencia de fondo en las reacciones múltiples. Para comprobar la eficiencia de la reacción de RTi-PCR múltiple se compararon los valores de C_T para cada uno de los patógenos con las correspondientes reacciones individuales (RTi-PCR simple), en modo TaqMan. En el caso de *Sta. aureus*, fueron muy similares para todas las concentraciones ensayadas mientras que en el caso de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, los valores de C_T resultaron ligeramente superiores en la reacción múltiple, lo que sugiere un ligero descenso en la sensibilidad de la reacción de PCR. No obstante, la reacción simple presentó señal en el nivel más bajo (1 eg/reacción) para todos los patógenos, pero los valores de C_T fueron próximos a 40 (negativo), por lo que consideramos como límite de detección 10 eg/reacción para ambas reacciones, simple y múltiple. Así mismo, en otros estudios como el de Corless *et al.* (2001) tampoco se observaron diferencias de sensibilidad entre la reacción simple y múltiple para la detección de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* utilizando cultivos puros.

Comparando con otras reacciones de RTi-PCR, múltiple la sensibilidad de la reacción desarrollada en este estudio es del mismo orden que las descritas en trabajos previos para la detección de *E. coli* O157:H7, 8 céls/reacción (Jothikumar y Griffiths, 2002), mientras que iguala o mejora los niveles de detección descritos para este mismo

patógeno por Sharma *et al.* (1999), 50 céls/reacción en la múltiple y entre 17 y 170 céls/reacción para la PCR simple, y por Jothikumar *et al.* (2003) para *Salmonella* y *L. monocytogenes*, 10^2 y 10 ufc/reacción, respectivamente. También mejora los límites de la PCR múltiple convencional, sin enriquecimiento, para *Salmonella* y *Sta. aureus* en uno y dos ordenes logarítmicos, respectivamente, obtenidos en un estudio previo del grupo (Alarcón *et al.*, 2004).

Los ensayos con DNA purificado de los tres patógenos en diferentes cantidades, revelaron que la RTi-PCR múltiple permitía detectar todas las dianas tanto mediante el sistema SYBR Green como TaqMan cuando se encontraban en 10 y 10^2 eg/reacción. Sin embargo, al combinar 10 y 10^4 eg/reacción, la diana que se encontraba en menor cantidad no era detectada. Esto mismo sucedía en los ensayos de detección en espinacas y lechuga “Little Gem” inoculados con los tres patógenos, en diferentes proporciones, donde mediante RTi-PCR múltiple, no se detectaría el patógeno presente en 10^3 ufc/g si alguno de los otros se encuentra en 10^6 ufc/g. Sin embargo, esto es un hecho poco probable ya que los resultados de cuantificación obtenidos en este estudio mostraron que los niveles de de los patógenos en las muestras naturales se sitúan mayoritariamente entre 10^2 y 10^4 ufc/g. La amplificación preferente de determinadas dianas en una reacción múltiple es un fenómeno bien conocido. Se debe principalmente a la variación en las interacciones entre los reactivos de la reacción de PCR en presencia de baja concentración del DNA diana sobretodo en los primeros ciclos de la reacción (Mutter y Boyton, 1995). Por ello, el patógeno que se encuentra en menor cantidad se ve desfavorecido.



Estos resultados coinciden con los obtenidos por Wolffs *et al.* (2007) en una reacción doble para la detección de *Campylobacter* y *Salmonella*. También, Wang *et al.* (2007) observaron este mismo efecto en una RTi-PCR triple para la detección de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Shigella*.

Mediante ensayos de inoculación en brócoli, con cantidades similares de los tres patógenos, se consiguió detectar por RTi-PCR múltiple en modo TaqMan hasta 0,9, 1,8 y 4,8 ufc/reacción de *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, y *Sta. aureus*, respectivamente, que corresponden a 10^3 ufc/g de cada uno. Es por tanto, un orden logarítmico menos sensible que las reacciones de RTi-PCR ensayadas en el apartado 2.2. No obstante, una menor sensibilidad en la reacción múltiple es esperable ya que se desarrolla con una cantidad limitada de enzima y nucleótidos por lo que las distintas reacciones individuales que se producen simultáneamente compiten por el mismo conjunto de reactivos (Markoulatos *et al.*, 2002). Nuestros resultados mostraron que en la RTi-PCR diseñada, la amplificación de cada uno de los tres genes es eficiente, incluso en presencia de los otros pares de cebadores y sondas. Este resultado coincide con el nivel de detección descrito para la PCR aplicada al análisis de alimentos (Maurer, 2006) por lo que consideramos que el rendimiento de la RTi-PCR múltiple desarrollada es adecuado para su utilización en alimentos. A este respecto, iguala e incluso mejora, los niveles de detección reportados en la bibliografía para reacciones de RTi-PCR simples aplicadas a alimentos, sin enriquecimiento previo. Por ejemplo, Seo *et al.* (2004) describieron un sistema de RTi-PCR para la detección de *Salmonella*, en huevo crudo, tras extracción de DNA utilizando PrepMan Ultra (AppliedBiosystems) que permitía la

detección de 10^3 ufc/ml; Fu *et al.* (2005) obtuvieron una sensibilidad de $1,3 \times 10^4$ células/g para *E. coli* O157:H7 en carne de ternera, combinando un paso de separación inmunomagnética con la RTi-PCR; Alarcón *et al.* (2006) obtuvieron una sensibilidad de $4,9 \times 10^3$ ufc/g para *Sta. aureus* a partir de muestras de ternera inoculadas artificialmente utilizando el mismo método de extracción de DNA utilizado en este trabajo (DNeasy Tissue Kit, Qiagen). Niveles de detección más bajos solamente se han descrito tras varias horas de enriquecimiento de la muestra en ensayos con *E. coli* O157:H7 en leche (Bohra *et al.*, 2001) o *Salmonella* spp. en carne (Kimura *et al.*, 1999). A la vista de estos resultados la reacción de RTi-PCR múltiple diseñada en este trabajo, es eficiente para la detección simultánea y automatizada de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus*.

En cuanto a la implantación de esta metodología como técnica rápida en el análisis rutinario de alimentos, cabe señalar que la legislación actual exige la ausencia de *Salmonella* spp. en 10 ó 25 g de alimento y recomienda los mismo parámetros para *E. coli* O157:H7. Lo mismo ocurre para *L. monocytogenes*, en aquellos alimentos que permitan su desarrollo, y para *Sta. aureus* en determinadas conservas y carnes. Este requerimiento no puede cumplirse mediante la detección directa con RTi-PCR, a pesar de la buena sensibilidad demostrada en este trabajo, ya que existe una limitación en el tamaño de la muestra que puede analizarse por PCR. Además, la cuantificación directa de los patógenos puede sufrir desviaciones con respecto a la cantidad real debido a la incapacidad de la PCR para diferenciar entre microorganismos vivos y muertos. Para soslayar estos inconvenientes se introdujo un paso

enriquecimiento en agua de peptona, observándose que en tan sólo 6 horas se conseguía la detección por RTi-PCR múltiple de hasta 1 célula de cada uno de los patógenos en 25 g de alimento, ajustándose de este modo a la normativa vigente para garantizar la ausencia de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- La comparación de los cuatro métodos comerciales de extracción de DNA, realizada en base a la sensibilidad en la detección por PCR de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Sta. aureus*, ha demostrado que existen diferencias significativas entre ellos, tanto en función del patógeno como de la matriz en la que se encuentran. El método DNeasy Tissue Kit (Qiagen) ha resultado el más eficiente para la extracción de DNA de los cuatro patógenos, en las tres matrices vegetales ensayadas.

2.- Para la detección cuantitativa de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Sta. aureus* se han puesto a punto las reacciones de RTi-PCR con cebadores seleccionados de la bibliografía. Tras optimizar las condiciones de reacción, los ensayos de RTi-PCR en muestras inoculadas, han mostrado un límite de cuantificación y detección de 10^2 ufc/g, para los cuatro patógenos, corroborando los niveles establecidos con DNA y cultivos puros. Este valor es un orden logarítmico inferior al establecido para PCR convencional en alimentos, demostrando la mayor sensibilidad de la RTi-PCR en la detección de patógenos.

3.- La aplicación directa de la RTi-PCR en alimentos de contaminación natural ha permitido cuantificar los patógenos presentes en el 67 % de las muestras positivas por PCR convencional, revelando que *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 se encuentran en niveles de 10^3 ufc/g, *L. monocytogenes* de 10^2 ufc/g y *Sta. aureus* de 10 ufc/g y que las muestras restantes (33%) presentaban niveles inferiores a 10 ufc/g.

4.- Al comparar la RTi-PCR directa con el procedimiento mini-VIDAS para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* en 328 muestras de alimentos de contaminación natural, se concluye que ambas técnicas presentan una especificidad similar pero la RTi-PCR se comporta mejor en cuanto a “sensibilidad” y “seguridad” aún asumiendo que su aplicación directa, sin enriquecimiento, estará ofreciendo un resultado sesgado con posibles “falsos negativos”. Queda demostrada la utilidad de la RTi-PCR como técnica diagnóstica para la detección de patógenos en alimentos.

5.- En base a los resultados obtenidos, proponemos la RTi-PCR para su utilización como método de rastreo de los patógenos investigados en el análisis de alimentos. Es una técnica rápida y sensible que permite completar el análisis en unas 5-6 horas, en lugar de las 24-72 horas que requieren otras técnicas como el mini-VIDAS, con lo que resulta más adecuada para el análisis rutinario de alimentos. Sólo las muestras negativas se analizarían por PCR, tras enriquecimiento, para asegurar la ausencia del patógeno.

6.- Se ha diseñado un nuevo sistema de cebadores y sonda TaqMan específico para *Salmonella*, con valores de T_m ($80,2 \pm 0,1$ °C) y C_T ($14,81 \pm 0,52$) muy similares en las 198 cepas ensayadas, y límite de detección de 1 cél o eg/reacción, lo que demuestra su validez para la detección de *Salmonella* spp. Además, en su aplicación en muestras de alimentos de contaminación natural, ha conseguido resultados iguales e incluso mejores que los obtenidos con los cebadores diseñados por Hoorfar *et*

al., (2000) utilizados en este estudio para la detección de *Salmonella* en alimentos de contaminación natural.

7.- Combinando el sistema TaqMan diseñado para *Salmonella* spp. con los previamente utilizados para *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus*, se ha puesto a punto una reacción de RTi-PCR múltiple que incluye 6 cebadores y tres sondas, marcadas con VIC, NED y FAM, que permite la detección simultánea y cuantitativa de los tres patógenos, con un límite de detección de 10 eg/reacción, para cada uno de ellos, demostrando la misma eficiencia que las correspondientes reacciones simples.

8.- La aplicación de la RTi-PCR múltiple, tras un paso enriquecimiento de tan sólo 6 horas en Agua de Peptona Tamponada, ha permitido la detección de hasta 1 célula de cada uno de los patógenos en 25 g, mediante ensayos en muestras de alimentos inoculados. Por lo tanto, queda demostrada su validez como técnica analítica para ajustarse a la legislación cuando se exige “ausencia” del patógeno, como es el caso de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 o de *Sta. aureus* en algunos alimentos.

VII. ANEXOS

ANEXO I. Normas ISO citadas en este trabajo

- ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 11290-2:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 2: Enumeration method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 6888-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 6888-2:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 6888-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 3: Detection and MPN

technique for low numbers. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuff – Protocol for the validation of alternative methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 11290-1:1996/AM1:2004 Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection. Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data, (2005). EN ISO 11290-1:1997/A1:2005, International Organisation for Standardisation, Geneva.

ISO 20836: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Performance testing for thermal cyclers. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 20837: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 20838: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ANEXO II. Detalle de los resultados de cuantificación de las muestras que resultaron positivas por alguna de las técnicas empleadas para los cuatro patógenos investigados

Tabla 34. *E. coli* O157:H7

	Lab1			Lab2	
	Mini-VIDAS	PCR ^a	RTi-PCR ^{b, c}	PCR ^a	RTi-PCR ^{b, c}
Acelga	nd	nd	nd	+	99
Agua Pozo	-	nd	nd	+	0
Agua Riego	-	nd	nd	+	0
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	3060
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	2,1 x 10 ⁶
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	2188
Brócoli congelado	-	nd	nd	+	662
Brócoli congelado	-	+	845	+	710
Brócoli congelado	-	+	1416	+	1532
Brócoli congelado	-	+	7219	+	6375
Brócoli escaldado	-	+	3945	+	4197
Calabacín Rodajas	-	nd	nd	+	0
Cebolla	+	nd	nd	+	328
Cebolla	+	nd	nd	-	0
Col Milán Salima	-	-	0	+	0
Col picuda	-	+	35.2	+	0
Col picuda	-	+	0	+	0
Endivias	-	+	12	+	29
Ensalada Crudites	nd	nd	nd	+	nd
Ensalada Escarola	-	+	1.7 x 10 ⁴	+	2,44 x 10 ⁴
Ensalada Gourmet	nd	nd	nd	+	nd
Ensalada Milenio	nd	nd	nd	+	nd
Ensalada Variada	nd	nd	nd	+	nd
Espinacas	-	+	152	+	0
Lechuga Iceberg	nd	nd	nd	+	6728
Lechuga Iceberg	-	-	0	+	0
Lechuga Iceberg	-	+	0	+	0
Lechuga Romana	-	+	0	+	0
Lechuga Romana	+	+	20	+	15
Pac Choi	-	+	2693	+	3340
Pechuga	-	+	0	+	23
Pimentón	nd	nd	nd	+	0
Pimiento amarillo	-	nd	nd	+	0
Pimiento tiras	nd	nd	nd	+	nd
Pimiento tricolor	-	nd	nd	+	0
Pimiento tricolor	-	+	0	+	0
Pimiento tricolor	-	+	730	+	764
Pimiento tricolor	-	+	562	+	0
Pimiento tricolor	-	+	0	+	0
Pollo plancha	-	-	0	+	0
R. Rocket	-	+	0	+	0
Rucola	nd	nd	nd	+	0

Tabla 34. (Continuación)

	Lab1			Lab2	
	Mini-VIDAS	PCR ^a	RTi-PCR ^{b, c}	PCR ^a	RTi-PCR ^{b, c}
Rucola	-	+	85.8	+	0
Rucola	nd	+	2.5 x 10 ⁴	+	3.2 x 10 ⁴
Tomate	-	+	13956	nd	nd
Tripa de pollo	-	+	310	+	0

Sombreado, muestras que se han incluido en el análisis estadístico; nd, no determinado

^aResultados de PCR convencional utilizando los cebadores PT2/uidAR

^bResultados de RTi-PCR utilizando los cebadores uidAF/uidAR y la sonda uidAP

^cCuantificación en función de la curva patrón de DNA purificado en eg/g

Tabla 35. *L. monocytogenes*

	Lab1			Lab2	
	Mini-VIDAS	PCR ^a	RTi-PCR ^b	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}
Alcaparras	-	-	-	+	0
Apio Rodajas	+	-	-	-	nd
Aros Cebolla	+	nd	nd	+	nd
Berenjena Rodajas	+	nd	nd	+	0
Berenjenas	+	nd	nd	+	675
Brócoli congelado	+	-	-	-	nd
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	1494
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	530
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	2022
Brócoli congelado	+	nd	nd	-	nd
Brócoli congelado	+	+	+	+	370
Brócoli congelado	+	+	+	+	426
Brócoli congelado	+	nd	nd	+	nd
Brócoli escaldado	+	+	+	+	20
Calabacín	-	nd	nd	+	256
Cebolla	-	nd	nd	+	nd
Cebolla	-	nd	nd	+	201
Col picuda	-	+	-	+	25
Col picuda	-	+	+	+	19
Empanadillas atún	-	+	+	+	102
Endivias	+	+	+	+	0
Ensalada Atún	+	nd	nd	-	nd
Ensalada Crudites	nd	nd	nd	+	nd
Ensalada Escarola	-	+	-	-	-
Ensalada Estación	+	+	+	-	-
Ensalada Gourmet	nd	nd	nd	+	nd
Ensalada Italiana	-	nd	nd	+	nd
Ensalada Italiana	+	nd	nd	-	nd
Ensalada Jamón	+	nd	nd	-	nd
Ensalada Mesclun	-	nd	nd	+	nd
Ensalada Radiccio	-	nd	nd	+	nd
Ensalada Rucola	-	+	+	+	142
Ensalada Rucola	nd	-	-	+	90
Ensalada Variada	nd	nd	nd	+	nd
Flamenquín York	-	+	-	+	33
Judía 10mm	-	+	+	+	100
Lechuga	-	nd	nd	+	nd
Lechuga Iceberg	+	nd	nd	+	454
Lechuga Iceberg	-	nd	nd	+	nd
Lechuga Iceberg	+	+	+	-	0
Lechuga romana	-	+	+	+	323
Pavo blanqueta	+	-	-	-	nd

Tabla 35. (Continuación)

	Lab1			Lab2	
	Mini-VIDAS	PCR ^a	RTi-PCR ^b	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}
Pechuga pollo	+	-	-	-	nd
Pimiento amarillo	+	nd	nd	+	278
Pimiento amarillo	+	nd	nd	+	0
Pimiento amarillo	+	nd	nd	-	nd
Pimiento rojo	+	nd	nd	+	nd
Pimiento tricolor	+	+	+	+	73
Pimiento tricolor	+	+	+	+	61
Pimiento tricolor	+	+	+	+	89
Pimiento tricolor	-	nd	nd	+	nd
Pimiento tricolor	+	nd	nd	-	nd
Pimiento tricolor	+	-	-	-	nd
Pimiento tricolor	+	nd	nd	-	nd
Pimiento tricolor	+	+	+	-	nd
Pimiento tricolor	+	nd	nd	+	0
Redina	-	+	+	+	431
Romanescu	+	nd	nd	+	108
San Jacobo	+	+	+	+	29
San Jacobo	+	+	+	+	0
Sopa juliana	-	-	-	+	32
Surimi trozos	-	-	-	+	0
Zanahoria	-	+	+	+	893

Sombreado, muestras que se han incluido en el análisis estadístico; nd, no determinado

^aResultados de PCR convencional utilizando los cebadores hlyF/hlyR

^bResultados de RTi-PCR utilizando los cebadores hlyF/hlyR y la sonda hlyP

^cCuantificación en función de la curva patrón de DNA purificado en eg/g

Tabla 36. *Salmonella* spp.

	Lab1			Lab2	
	mini-VIDAS	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}
Aji/CBC especias	-	-	0	+	0
Artesana Pollo	-	-	-	+	19
Brócoli	-	+	6042	+	6152
Brócoli	-	+	7150	+	6760
Brócoli	-	-	0	+	0
Brócoli	-	-	0	+	0
Brócoli congelado	-	+	543	+	410
Brócoli congelado	-	+	12	+	19
Brócoli congelado	-	+	205	+	140
Caviar	-	-	0	+	3520
Caviar	-	-	0	+	0
Caviar	-	-	0	+	261
Cebolla	-	nd	nd	+	7700
Cebolla	-	nd	nd	+	nd
Chili	+	-	0	-	0
Col picuda	-	+	15900	+	16628
Col picuda	-	+	7300	+	6930
Coliflor	-	+	11915	+	12000
Coli-Rábano	-	+	11400	+	10996
Conserva Cebolla	-	-	-	+	0
Ensalada Escarola	-	+	0	+	0
Ensalada estación	-	+	1915	+	2003
Ensalada estación	-	+	0	+	28
Ensalada Italiana	-	nd	nd	+	nd
Ensalada Mesclun	-	-	0	+	180
Ensalada Radiccio	-	nd	nd	+	nd
Ensalada Radiccio	-	nd	nd	+	nd
Ensalada Rucola	-	+	3100	+	2710
Ensalada Rucola	-	+	15300	+	11945
Ensalada Vips	-	+	1612	+	1551
Ensalada variada	-	+	1318	+	1230
Espinacas	-	+	17	-	0
Espinacas	-	-	0	+	0
Golosinas	-	nd	nd	+	2780
Lechuga	-	nd	nd	+	nd
Lechuga Iceberg	-	nd	nd	+	nd
Lechuga Iceberg	-	+	2970	+	3320
Lechuga Iceberg	-	+	0	+	0
Lechuga Romana	-	+	36	+	15
Lechuga Romana	-	+	67	+	35
Materia Orgánica	+	nd	nd	-	nd
Mejillón	+	-	0	-	0

Tabla 36. (Continuación)

	Lab1			Lab2	
	mini-VIDAS	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}
Morrison Little	-	+	10	+	0
Pavo blanqueta	-	+	2355	+	2450
Pavo blanqueta	-	-	0	+	0
Pechuga	-	+	0	+	0
Pechuga Pollo	-	+	3425	+	3926
Pechuga Pollo	-	+	3998	+	4612
Pimentón	-	nd	nd	+	nd
Pimentón	+	nd	nd	-	nd
Pimentón	+	nd	nd	+	nd
Pimentón	+	+	105	+	0
Pimentón	+	+	0	+	0
Pimentón	+	-	0	-	0
Pimentón	+	-	0	-	0
Pimentón	+	-	0	-	0
Pimiento tricolor	+	-	0	-	0
Pimiento tricolor	-	+	950	+	1138
Pimiento tricolor	+	+	300	+	270
Pimiento tricolor	-	+	125	+	99
Pimiento tricolor	-	+	172	+	167
Pimiento verde	+	nd	nd	-	nd
Rucola Selvática	+	+	0	+	29
Tripa de pollo	+	+	683	+	456

Sombreado, muestras que se han incluido en el análisis estadístico; nd, no determinado

^aResultados de PCR convencional utilizando los cebadores JHOL/JHOR

^bResultados de RTi-PCR utilizando los cebadores JHOL/JHOR y la sonda JHOP

^cCuantificación en función de la curva patrón de DNA purificado en eg/g

Tabla 37. *Sta. aureus*

	Lab1		Lab2	
	Recuentos	PCR ^a	PCR ^a	RTi-PCR ^{b,c}
Alcaparras	-	+	+	0
Apio en rodajas	+	+	+	14
Brócoli congelado	+	+	+	3
Caviar	-	+	-	nd
Caviar	-	+	-	nd
Caviar	-	+	-	nd
Empanada Atún	-	+	+	0
Ensalada Atún	<100		+	nd
Ensalada Italiana	<100	+	nd	
Ensalada Jamón	<100		+	nd
Espinacas	-	-	+	0
Huevas Mujol	+	+	+	55.3
Judía 10mm	-	-	+	0
Lechuga Iceberg	nd		+	28
Lechuga Iceberg	<100		+	nd
Lechuga Romana	nd		+	49
Lechuga Romana	<100	+	nd	
Pavo blanqueta	+	+	+	80
Pimiento rojo	<100		+	nd
Pimiento rojo	<100	+	nd	nd
Pimiento tricolor	+	+	+	51
Pimiento verde	<100		+	nd
Pollo	+	+	+	59
R. Rocket	-	-	+	26
Rucola	-	-	+	6
Surimi	-	+	-	0
Zanahoria	+	+	-	-
Zanahoria	<100	+	nd	

Sombreado, muestras que se han incluido en el análisis estadístico; nd, no determinado

^aResultados de PCR convencional utilizando los cebadores 5F/465R

^bResultados de RTi-PCR utilizando los cebadores 5F/465R y la sonda nucP402

^cCuantificación en función de la curva patrón de DNA purificado en eg/g

**ANEXO III. Artículos publicados (o en proceso de publicación) con los
resultados de este trabajo**

Research Note

Comparison of Four Commercial DNA Extraction Kits for PCR Detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in Fresh, Minimally Processed Vegetables

P. ELIZAQUIVEL¹ AND R. AZNAR^{1,2*}

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; and ²Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain

MS 08-147; Received 25 March 2008/Accepted 21 April 2008

ABSTRACT

Four commercial DNA extraction methods, PrepMan Ultra (Applied Biosystems), InstaGene Matrix (BioRad), DNeasy Tissue kit (Qiagen), and UltraClean (MoBio), were tested for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. For comparative purposes, sensitivity assays with specific PCRs were carried out after DNA extraction with the four methods in green pepper, broccoli, and onion artificially inoculated with the four pathogens separately. As confirmed by statistical analysis, the DNeasy Tissue kit rendered the highest sensitivity values in the three matrices assayed for *Salmonella*, *L. monocytogenes*, and *E. coli* O157:H7 and in onion for *S. aureus*. Despite being the most expensive of the methods compared, the DNeasy Tissue Kit can be successfully applied for any of the four most commonly studied pathogens, thus saving time and overall reducing the cost of the analysis.

The PCR is a molecular approach that is currently well established as a rapid, sensitive, and specific detection technique. In the last 10 years this technique has been applied more frequently to the detection of foodborne pathogens in food as an alternative to traditional time-consuming culture-based techniques. However, limitations of PCR methods for detection of bacterial pathogens in food also are well known. Among these, the inhibition of the amplification reaction is one of the most limiting factors and can cause complete reaction failure, leading to false-negative results or reduced sensitivity of detection. Inhibition might be driven by interference with the cell lysis necessary for DNA extraction, by nucleic acid degradation or capture, and by inhibition of the polymerase activity necessary for amplification of the target DNA (22). Organic and phenolic compounds and polysaccharides are among the inhibitors associated with vegetable foods. A suitable DNA extraction procedure would be needed to overcome inhibition of nucleic acid amplification. Experimentation has revealed that more laborious extraction methods provide higher yields of purer DNA, particularly from complex samples such as sediments and foods (3, 23). However, for routine microbiological analyses of food, rapid and standardized extraction methods are desirable to allow high sample throughput. Several commercial kits have been developed to meet these requirements and are being progressively employed in PCR-based detection studies. Comparative assays of the ef-

iciency of these methods have focused on food matrices, such as maize, vegetables (7), animal specimens (12), and single pathogens such as *Salmonella enterica* Enteritidis from poultry (6) and from environmental substrates (14), *Yersinia enterocolitica* from meat (15), *Listeria monocytogenes* from meat and other food types (2, 3), *Escherichia coli* O157:H7 from cattle manure (22) and food samples (9), *Staphylococcus aureus* from raw meat and meat products (1), and *Salmonella* Typhimurium from swine feces (8). Results of these studies are difficult to compare because different commercially available kits are usually used to assay single pathogens. However, in food safety analysis usually more than one bacterial pathogen can be found in a sample, and rates of recovery may differ between microbial species (23). Thus, a single rapid and standardized DNA extraction method that works efficiently for a variety of foodborne pathogens would be very helpful for use with PCR-based food analysis methods.

In recent years, the demand for fresh fruits and vegetables has increased worldwide because of the awareness of the health benefits associated with eating fresh produce (13). However, outbreaks of foodborne diseases associated with fresh minimally processed vegetables have been attributed to *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 (21). These pathogens are not frequently found on produce but are of great concern to public health because of the severe consequences derived from infection by these organisms. *L. monocytogenes* is among the emerging foodborne pathogens that can contaminate a variety of food products, including veg-

* Author for correspondence. Tel: + 34 96 3900022; Fax: + 34 96 3939301; E-mail: rosa.aznar@uv.es.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Food Microbiology

A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables

Patricia Elizaquível^a, Rosa Aznar^{a,b,*}^a Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Burjassot E-46100, Valencia, Spain^b Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), P.O. Box 73, Burjassot E-46100, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2007

Received in revised form

25 February 2008

Accepted 1 March 2008

Available online 7 March 2008

Keywords:

Multiplex RTi-PCR

E. coli O157:H7*St. aureus**Salmonella*

ABSTRACT

In this work, a new multiplex single-tube real-time PCR approach is presented for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*, three of the more frequent food-borne bacterial pathogens that are usually investigated in a variety of food matrices. The study includes the design and specificity testing of a new primer and probe specific for *Salmonella* spp. Reaction conditions were adjusted for the simultaneous amplification and detection of specific fragments in the β -glucuronidase (*uidA*, *E. coli*) and *Thermonuclease* (*nuc*, *St. aureus*) genes, and in the replication origin sequence (*oriC*, *Salmonella* spp.). Melting-curve analysis using a SYBR Green I RTi-PCR approach showed characteristic T_m values demonstrating the specific and efficient amplification of the three fragments. Subsequently, a TaqMan RTi-PCR approach was settled, using FAM, NED and VIC fluorescently labeled specific probes for an automated detection. It was equally sensitive than uniplex RTi-PCR reactions in *St. aureus* and *E. coli* O157:H7, using same amounts of purified DNA, and allowed detection of 10 genome equivalents in the presence of 10^2 or 10^4 genome equivalents of the other two pathogens. Finally it was tested in artificially inoculated fresh, minimally processed vegetables, revealing a sensitivity of 10^2 CFUg⁻¹ each of these pathogens in direct detection, following DNA extraction with DNeasy Tissue kit (Qiagen). The multiplex RTi-PCR developed scored the sensitivity recognised for PCR in food and it allows a high-throughput and automation, thus it is promising as a rapid and cost-effective test for the food industry.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, the growing consumption of fresh, minimally processed vegetables has led to an increase in the number of outbreaks of food-borne disease linked to fresh produce (Anon, 2002). Agricultural irrigation with wastewater that can be raw, treated and/or partially diluted, is a common practice worldwide and constitutes the main source of pathogen contamination (Toze, 2006). Therefore, fresh or minimally processed vegetables which are often eaten raw or minimally processed, can compromise consumer health safety. The most common bacterial enteropathogens associated with fruits and vegetables are *Salmonella* spp. (Thunberg et al., 2002) and *Escherichia coli* O157:H7 (Rangel et al., 2005). They are considered among the organisms that are most likely to cause an outbreak and therefore need to be studied for produce safety (Buck et al., 2003). *Salmonella* is responsible for a

localized, self-limiting bacterial infection of the intestinal epithelium, known as “non-typhoid salmonellosis” or “gastroenteritis” and a systemic infection known as “typhoid” or “enteric fever” with severe consequences. The incidence of typhoid salmonellosis is stable, with very few cases in developed countries, but cases of non-typhoid salmonellosis are increasing worldwide (García del Portillo, 2000). *E. coli* O157:H7 is the most toxigenic serotype of the genus and is an important cause of diarrhoea, hemorrhagic colitis and haemolytic-uremic syndrome worldwide, associated with high mortality rates of between 10% and 40% (Chen and Frankel, 2005). *Staphylococcus aureus* is the species most commonly associated with staphylococcal food poisoning. It is usually found in ready-to-eat foods since contamination frequently occurs through improper handling, and between up to 30% and 50% of the human population carries *St. aureus* as commensals (Le Loir et al., 2003). All three pathogens are among the food-borne bacteria currently observed in a wide range of food products since they are frequently reported as the causative agents in food poisoning. Furthermore, they are the human pathogens that cause the most economically important food-borne diseases throughout the world.

* Corresponding author at: Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, Apartado de Correos 73, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain. Tel.: +34 96 390022; fax: +34 96 3636301.

E-mail address: rosa.aznar@iata.csic.es (R. Aznar).

Comparative Evaluation of RTi-PCR and Mini-VIDAS SLM System as Predictive Tools for the Routine Detection of *Salmonella* spp. in Naturally Contaminated Food Products

P. Elizaquível · J. A. Gabaldón · R. Aznar

Received: 16 April 2008 / Accepted: 30 June 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract In the present work, we have evaluated a real-time polymerase chain reaction-based method (RTi-PCR) as a routine laboratory test, by comparing the results obtained in two laboratories with the mini-VIDAS SLM (bioMérieux), a standard accepted immunoenzymatic (enzyme-linked immunosorbent assay) method currently used in the food industry. To that aim, a set of 141 naturally contaminated food samples were analyzed after an enrichment step by conventional PCR and mini-VIDAS and prior to the enrichment by RTi-PCR. Results from both laboratories were statistically analyzed using the kappa coefficients, which indicated a perfect agreement between them. Out of the 141 samples, 11 were positive for *Salmonella* detection by mini-VIDAS, 35 by conventional PCR in Lab1, and 44 in Lab2. Twenty-eight of them tested positive by RTi-PCR in Lab1 and 31 in Lab2. In order to use the evaluated methods as a diagnostic test, their predictive capacity was analyzed on the basis of their positive and negative predictive values, calculated using the result obtained—after enrichment—by conventional PCR as the “gold standard.” Both positive and

negative predictive values were higher for RTi-PCR than those obtained for mini-VIDAS, indicating good performance of the RTi-PCR technique—applied without enrichment—in the detection of *Salmonella* in food products. Overall, results obtained in this study on naturally contaminated food products highlighted that RTi-PCR without enrichment is a better predictive tool than mini-VIDAS.

Keywords *Salmonella* spp. · Mini-VIDAS SLM · PCR · RTi-PCR · Food

Introduction

Salmonella spp. is one of the most common and widely distributed foodborne pathogens. It constitutes a major public health burden and represents a significant cost in many countries (WHO 2005). The reservoir for this pathogen is mainly the gastrointestinal tract of mammals and birds often adopting asymptomatic infection (Blümner et al. 2000; Guard-Petter 2001). Consumption of contaminated eggs, meat, and meat products is the main cause for salmonellosis outbreaks. However, in recent years, the growing consumption of ready-to-eat products has led to an increase in the number of salmonellosis outbreaks linked to different kinds of food products including fresh produce (Anon 2002). This kind of product can be contaminated due to agricultural irrigation with wastewater, which can be raw, treated, and/or partially diluted (Toze 2006).

The standard culture method (ISO 2002) to detect *Salmonella* in food products requires between 4 and 5 days to obtain presumptive positive or negative results (ISO 1998, 2002) and can take up to 7 days depending on the realization of biochemical and serological confirmations (Van der Zee and Huis in't Veld 2000). As an alternative to

P. Elizaquível · R. Aznar
Departamento de Microbiología y Ecología,
Universidad de Valencia,
Valencia, Spain

J. A. Gabaldón
Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación,
Departamento de Seguridad Alimentaria,
Murcia, Spain

R. Aznar (✉)
Departamento de Biotecnología,
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Apartado de Correos 73,
46100 Burjassot, Valencia, Spain
e-mail: rosa.aznar@iata.csic.es



1 Evaluation of Real Time PCR as diagnostic test for the detection of
2 bacterial pathogens in naturally contaminated food products

3

4

5

6 Elizaquível, P.¹, Gabaldón, J.A.², Aznar, R.^{1,3*}

7

8 1 Departamento de Microbiología y Ecología. Universitat de València.

9 2 CTC, Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.

10 3 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de
11 Investigaciones Científicas.

12

13

14

15 **Running head:** Real Time PCR as diagnostic test for foodborne pathogens

*Corresponding author: Rosa Aznar. Departamento de Biotecnología.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Apartado de Correos
73. E-46100 Burjassot, Valencia (Spain).

Tel.: + 34 96 3900022; Fax: + 34 96 3939301; E-mail: rosa.aznar@uv.es

VIII. BIBLIOGRAFIA

A

Anónimo (2003). Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC (OJ L 325, 12.12.2003, p. 31)

Anónimo (2005). Reglamento (CE) no 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22.12.2005, p. 1

Anónimo (2007a). The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006, The EFSA Journal, 130

Anónimo (2007b). Reglamento CE N° 2073/2005 de la Comisión relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea.

Alarcón, B., García-Cañas, V., Cifuentes, A., González, R., Aznar, R. (2004). Simultaneous and sensitive detection of three foodborne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7180-7186.

Alarcón, B., Vicedo, B., Aznar, R. (2006). PCR-based procedures for the detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. App. Microbiol.* 100: 352-364.

Allman, M., Höfelein, C., Köppel, E., Lüthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmüller, B., Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Res. Microbiol.* 146:85-97.

Altman, D. G., Bland, J.M. (1994a). Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ.* 11; 308(6943):1552.

- Altman, D. G., Bland, J. M. (1994b). Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ*. 9; 309(6947):102.
- Anderson, G. P., Taitt, C. A. R. (2005). Biosensors-based detection of food-borne pathogens. En "Foodborne pathogens: Microbiology and molecular biology" Ed. Frantamico, P., Bhunia, A.K., Smith, J.L., pp. 33-50. Caister academic press, Norfolk.
- Amagliani, G., Giammarini, C., Omiccioli E., Brandi G., Magnani M., (2007). Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control* 18: 1137-1142.
- Aznar, R., Alarcón, B. (2003). PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J. App. Microbiol.* 95: 958-966.
- Aznar, R., Solís, I. (2006). PCR detection of *Listeria monocytogenes* in different food products compared with the mini-VIDAS LMO system and the standard procedure ISO 11290-1. *J. Verbrauch. Lebensmitt.:* 1, 115-120.

B

- Barer, M. R., Harewood, C. R. (1999). Bacterial viability and culturability. *Adv. Microb. Physiol.* 41: 93-137.
- Barken, K. B., Haagenen, J. A. J., Tolker-Nielsen, T. (2007). Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clinica Chimica Acta.* 384: 1-11.
- Batt, C. A. (1997). Molecular diagnostics for dairy-borne pathogens. *J. Dairy Sci.* 80: 220-229.
- Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G. D. W., Holzapfel, W. H. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 127-131.

- Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., Kubista, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acid Res.* 31, e45.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M. L., Engvall, A. (1996). *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 35-47.
- Berrada H, Soriano JM, Picó Y, Mañes J. (2006a). Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 202-6.
- Berrada, H., Soriano, J. M., Mañes, J., Picó, Y. (2006b). Real-time quantitative PCR of *Staphylococcus aureus* and application in restaurant meals. *J. Food Prot.* 69: 106-11.
- Bhunja, A.K. (2008). Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of foodborne pathogens. *Adv. Food. Nutr. Res.* 54: 1-44.
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., McFall, M. E., King, R. K., Renter, D. G. (2007). A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *Food Prot.* 70: 1080-7.
- Bohra, L. K., Oberst, R. D., Phebus, R. K., Hays, M. P., Green, R. L., Sargeant, J. M. (2001). Evaluation of 5' nuclease based detection assays to detect *Escherichia coli* O157:H7 from food products. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.* 9: 143-160.
- Bono, J. L, Keen, J. E., Miller, L. C., Fox, J. M., Chitko-McKown, C. G., Heaton, M. P., Laegreid, W. W. (2004). Evaluation of a real-time PCR kit for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1855-1857.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2465-2467.

C

- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen P. N., Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141–11156.
- Chiang, Y. C., Fan, C. M., Liao, W. W., Lin, C. K., Tsen, H. Y. (2007). Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene htrA sequence. *J. Food Prot.* 70:2855-2859.
- Cirino, N. M., Musser, K. A., Egan, C. (2004). Multiplex diagnostic platforms for detection of biothreat agents. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4: 841-857.
- Cook, N. (2003). The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Microbiol. Meth.* 53: 165-174.
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A. J., Kaczmarski, E. B. (2001). Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicaemia using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1553-1558.
- Crosa, J.H., Brenner, D.J., Ewing, W.H., Falkow, S. (1973). Molecular relationships among the Salmonelleae. *J. Bacteriol.* 115: 307-315.

D

- Daum, L. T., Barnes, W. J., McAvin, J. C., Neidert, M. S., Cooper, L. A., Huff, W. B., Gaul, L., Riggins, W. S., Morris, S., Salmen, A., Lohman, K. L. (2002). Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr county, Texas. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3050-3052.
- Davies, R., Breslin, M. (2001). Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in laying flocks. *Vet. Record.* 149: 699-704.

- De Boer, E., Beumer, R. R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 119-30.
- Deiman, B., Van aarle, P., Sillekens, P. (2002). Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol. Biotechnol.* 20: 163-179.
- De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L. (2003). Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3456-3461.
- Di Bernardo, G., Del Gaudio, S., Galderisi, U., Cascino, A., Cipollaro, M., (2007). Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biothechnol. Progress.* 23: 297-301.
- Di Pinto, A., Forte, V., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena, F.P., Tantillo, G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18: 76-80.
- Doyle, M.P., Erickson, M.C. (2008). Summer meeting 2007- the problems with fresh produce: an overview. *J. App. Microbiol.* 105: 317-330.
- Donnenberg, M. S., Nataro, J. P. (2000). The molecular pathogenesis of *Escherichia coli* infections. En: Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin syntesis. Eds. Cary, J. W., Linz, J. E., Bhatnagar, D. pp 87-130. Technomic Publishing, Lancaster.

E

- Ellingson, J. L., Anderson, J. L., Carlson, S. A., Sharma, V.K. (2004). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol. Cell Probes.* 18: 51-57.

- Eriksson, E., Aspan, A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet. Res.* 22: 3-21.
- European Commission (2002). Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Report of scientific committee.
- Euzéby, J.P. (2008). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997: 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Last full update: November 05, 2008. URL: <http://www.bacterio.net>).
- Everis, L. (2004). Risk of pathogens in ready to eat fruits, vegetables and salads through the production process, review No. 44. Chipping Campden & Chorleywood food research association group.
- Eyigor, A., Carli, K. T., Unal, C. B. (2002). Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 37-41.
- Eyigor, A., Carli, K. T. (2003). Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Dis.* 47: 380-386.

F

- Farber, J. M., Peterkin, J. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476- 511.
- Fitzmaurice, J., Glennon, M., Duffy, G., Sheridan, J. J., Carroll, C., Maher, M. (2004). Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT 1 and VT 2 toxin genes in *E. coli* O157:H7. *Mol. Cell. Probes.* 18: 123-132.

- Fitzmaurice, J. (2006). Detection of verotoxin genes VT 1 and VT 2 in *Escherichia coli* O157: H7 in minced beef using immunocapture and real-time PCR. *Methods Mol. Biol.* 345: 91-96.
- Fluit, A. C., Widjojokusumo, A., Box, A. T., Torensma, R., Verhoef, J. (1993). Rapid detection of Salmonellae in poultry with the magnetic immunopolymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 13: 268-271.
- Food Standards Agency (FSA) (2007). Consumers attitudes to food standards, Wave 7. February 2007. London: Taylor Nelson Sofres plc. Disponible en: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cas07uk.pdf>
- Freschi, C. R., de Oliveira e Silva Carvalho, L. F., de Oliveira, C. J. B. (2005). Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Bra. J. Microbiol.* 36: 363-367.
- Fricker, M., Messelhäuber, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1892-1898.
- Fu, Z., Rogelj, S., Kieft, T. L. (2005). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 99: 47-57.

G

- García del Portillo, F. (2000). Molecular and cellular biology of *Salmonella* pathogenesis. En: Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Eds. Cary, J. W., Linz, J. E., Bhatnagar, D. pp 87-130. Technomic Publishing, Lancaster.

- Geng, T., Bhunia, A. K., (2007). Optical biosensors in foodborne pathogen detection. En "Smart biosensor technology". Ed. Knopf, G.K., Bassi, A.S., pp. 503-519. Taylor and Francis, Boca Raton, Florida.
- Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M., Zimmerhackl, L. B. (2002). Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J. Infect. Dis.* 186: 493-500.
- Gilbert, C., Winters, D., O'Leary, A., Slavik, M. (2003). Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Cell. Probes* 17: 135-138.
- Gillespie, B. E., Oliver, S. P. (2005). Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 88: 3510-3518.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., *et al* (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. (2007). Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Prot.* 70: 90-96.
- Gracias, K.S., McKillip, J.L. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can. J. Microbiol.* 50: 883-890.
- Grant, M.A., Hu, J., Jinneman, K.C. (2006). Multiplex real-time PCR detection of heat-labile and heat-stable toxin genes in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 69: 412-416.

Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G., Pathak, K. (2005). Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1340-1345.

H

Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., *et al.* (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 28: 11-22.

Heaton, J.C., Jones, K. (2007). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J. Appl. Microbiol.* 104: 613-626.

Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M., (2001). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3122-3126.

Hein, I., Jørgensen, H. J., Loncarevic, S., Wagner, M. (2005). Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Res. Microbiol.* 156: 554-563.

Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. (2006) Real-time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J. Microbiol. Methods.* 66: 538-547.

Heller, L. C., Davis, C. R., Peak, K. K., Wingfield, D., Cannons, A. C., Amuso, P. T., Cattani, J. (2003). Comparison of methods for DNA isolation from samples for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1844-1846.

- Herrman, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T., Voelkerding, K. V. (2006). Amplicon meeting análisis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin. Chem.* 52: 494-503.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (NY) 10: 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 11:1026-1030.
- Hill, W. E. (1996). The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 123-173.
- Hoff-Olsen P., Mevåg, B., Staalstrøm, E., Hovde, B., Egeland, T., Olaisen, B. (1999). Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *For. Sci. Int.* 105: 171-183.
- Hofstra, H., Huis in't Veld, J. H. J. (1990). Bioanalytical methods; The application of monoclonal antibodies and DNA hybridization in food microbiology. En: Processing and quality of food. Vol. 2. *Food Biotechnology* (P. Zeuthen *et al.*, Eds.), pp. 281-287. Elsevier, Londres.
- Hoorfar, J., Ahrens, P., Rådström, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3429-3435.
- Hoorfar, J., Wolffs, P., Rådström, P. (2004). Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *A.P.M.I.S.* 112: 808-14.

I

- Ibekwe, A. M., Watt, P. M., Grieve, C. M., Sharma, V. K., Lyons, S. R. (2002). Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of

Escherichia coli O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4853-4862.

Ibekwe, A. M., Grieve, C. M. (2003). Detection and quantification of *Escherichia coli* O157: H7 in environmental samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 94: 421-431.

Ivanova, N., Dewaard, J. R., Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol. Eco. Not.* 6: 997-1002.

J

Jinneman, K. C., Yoshitomi, K. J., Weagant, S. D. (2003). Multiplex real-time PCR method to identify shiga toxin genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157: H7/H- serotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6327-6333.

Jothikumar, N., Griffiths, M. W. (2002). Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 with multiplex real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3169-3179.

Jothikumar, N., Wang, X., Griffiths, M. W. (2003). Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 66: 2141-2145.

K

Kaclíková, E., Pangallo, D., Oravcová, K., Drahovská, H., Kuchta, T. (2005). Quantification of *Escherichia coli* by kinetic 5'-nuclease polymerase chain reaction (real-time PCR) oriented to *sfmD* gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 132-135.

Kathariou, S. (2000). Pathogenesis determinants of *Listeria monocytogenes*. En: Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Eds. Cary, J. W., Linz, J. E., Bhatnagar, D. pp 87-130. Technomic Publishing, Lancaster.

- Kauffmann, F. (1966). On the history of *Salmonella* research. *Zentralbl Bakteriol.* 201: 44-48.
- Kidd, I. M., Clark, D. A., Emery, V.C. (2000). A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. *J. Virol. Methods.* 87: 177-181.
- Kim, J. S., Lee, G. G., Park, J. S., Jung, Y. H., Kwak, H. S., Kim, S. B., Nam, Y. S., Kwon, S. T. (2007). A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.* 70: 1656-1662.
- Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Kusunoki, J., Itoh, T., Flood, S. J. A., (1999). Evaluation TaqMan PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. *J. Food Prot.* 62: 329-335.
- Klerks, M. M., Van Bruggen, A. H. C., Zijlstra, C., Donnikov, M. (2006). Comparison of methods of extracting *Salmonella enterica* serovar Enteritidis DNA from environmental substrates and quantification of organisms by using general internal procedural control. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3879-3886.
- Knutsson, R., Löfström, C., Grage, H., Hoorfar, J., Rådström, P. (2002) Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 40:52-60.
- Kumar, R., Surendran, P. K., Thampuran, N. (2008). Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 221-226.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, M. J., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S.G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B., Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor

groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acid Res.* 28: 729-737.

L

Law, D., Kelly, J. (1995). Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect. Immun.* 63: 700-702.

Lazcka, O., Del Campo, F. J., Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 22: 1205-1217.

Lebuhn, M., Effenberger, M., Garcés, G., Gronauer, A., Wilderer, P. A. (2004). Evaluating real-time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples. *Water Sci. Technol.* 50: 263-270.

Le Minor, L., Véron, M., Popoff, M. (1982a). A proposal for *Salmonella* nomenclature. *Ann Microbiol.* 133: 245-254.

Le Minor, L., Véron, M., Popoff, M. (1982b). The taxonomy of *Salmonella*. *Ann Microbiol.* 133: 223-243.

Le Minor, L., Popoff, M. (1987). Request for an Opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 465-468.

Li, Y., Mustapha, A. (2002). Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 508-512.

Liming, S. H., Bhagwat, A. A. (2004). Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 177-187.

- Lind, K., Stahlberg, A., Zoric, N., Kubista, M. (2006). Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting analysis. *Biotechniques*. 40: 315-319.
- Lipsky, R.H., Mazzanti, C.M., Rudolph, J.G., Xu, K., Vyas, G., Bozak, D., (2001). DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clin. Chem*. 47: 635-644.
- Little, C. L., Gillespie, I. A. (2008). Prepared salads and public health. *J. Appl. Microbiol.* Doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03801.x
- Liu, D. (2008). Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 229-242.
- Lucero Estrada, C. S. M., Velazquez, L. C., Di Genaro, S., Stefanini de Guzman, A. M. (2007). Comparison of DNA extraction methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection from meat food by nested PCR. *Food Res. Int.* 40: 637-642.
- Lynn, R. M., O'Brien, S. J., Taylor, C. M., Adak, G. K., Chart, H., Cheasty, T., Coia, J. E., Gillespie, I. A., Locking, M. E., Reilly, W. J., Smith, H. R., Waters, A., Willshaw, G. A. (2005). Childhood hemolytic uremic syndrome, United Kingdom and Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 590-596.

M

- Mackay, I.M., (2004). Real-Time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 190-212.
- Mafra, I., Silva, S. A., Moreira, E. J. M. O., Ferreira da Silva, C. S., Beatriz, M., Oliveira, P. P. (2008). Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*. 19: 1183-1190.
- Malorny, B., Tassios, P. T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 39-48.

- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7046-7052.
- Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N., Hoorfar, J. (2008). Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1299-1304.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16: 47-51.
- Maurer, J. J., (2006). The Mythology of PCR: a warning to the wise, p. 27-40. In J. J. Maurer (Ed.) PCR methods in foods. Food microbiology and food safety series. Springer, New York, NY.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., *et al.* (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.*;413:852-856.
- McKillip, J. L., Jaykus, L. A., Drake, M. (1998). rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4264-4268.
- McKillip, J. L., Drake, M. (2000). Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *J. Food Protect.* 63: 855-859.
- McKillip, J. L., Drake, M. (2004). Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food Prot.* 67:823-832.
- Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. (1998). Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals, en: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157: H7 and other shiga-toxin producing *E. coli* strains, American society for Microbiology, Washington DC. Pp. 121-128.

- Mercanoglu, B., Griffiths, M. W. (2005). Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts. *J. Food Prot.* 68: 557-61.
- Merk, S., Neubauer, H., Meyer, H., Greiser-Wilke, I. (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204: 127–131.
- Meyer, R., Lüthy, J., Candrian, U. (1991). Direct detection by polymerase chain reaction (PCR) of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 268-271.
- Miller, R. G., Mallinson, E. T. (2000). Improved detection of nontyphoid and typhoid Salmonellae with balanced agar formulations. *J. Food Prot.* 63: 1443-1446.
- Monis, P.-T., Giglio, S., Saint, C.P. (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal. Biochem.* 340: 24-34.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, H., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in-vitro: the polymerase chain reaction. Page 263 En: Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. Vol. 51. Molecular biology of *Homo sapiens*. Cold Spring Harbour Lab., Cold Spring Harbour, N.Y.
- Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, U. K. (2007). Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* 0157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods.* 68: 193-200.
- Murphy, N. M., McLauchlin, J., Ohai, C., Grant, K. A. (2007). Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 110-119.

Mutter, G. L., Boyton, K. A. (1995). PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acid Research*. 23: 1411-1418.

N

Nam, H. M., Srinivasan, V., Gillespie, B. E., Murinda, S. E., Oliver, S. P. (2005). Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 161-171.

Nguyen, L. T., Gillespie, B. E., Nam, H. M., Murinda, S. E., Oliver, S. P. (2004). Detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in beef products by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.* 1: 231-40.

Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K. (2006a). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods.* 67: 310-320.

Nocker, A., Camper, A. K. (2006b). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1997-2004.

Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A., Lillehaug, D. (2000). Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4266-4271.

Nugen, S. R., Baeumner, A. J. (2008). Trends and opportunities in food pathogen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 451-454.

O

- O' Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T. (2008). Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* 25: 75-84.
- O'Hanlon, K. A., Catarama, T. M., Duffy, G., Blair, I. S., McDowell, D. A. (2004). RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1013-1023.
- Oravcová, K., Kuchta, T., Kaclíková, E. (2007). A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 568-573.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. In Quimper-Froid Symposium proceedings, 16-18 June, 1997, ADRIA Quimper, p.6.

P

- Pan, Y., Breidt, F. Jr. (2007). Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 8028-8031.
- Palchetti, I., Mascini, M. (2008). Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 455-471.
- Park, J. H., Kim, J. S., Kwon, S.-T., Lee, D.S. (1993). Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 polymerase. *Eur. J. Biochem.* 214: 135-140.
- Park, S. H., Kim, H. J., Kim, H. Y. (2006). Simultaneous detection of *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* and *Shigella* spp. in lettuce using multiplex PCR method. *J. Microbiol. Biotech.* 16: 1301-1305.

- Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., Solomon, M. B. (2006). Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food Microbiol.* 23: 39-46.
- Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J., Fach, P. (2004). Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Mol. Cell. Probes.* 18: 409-420.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P. (2007). Screening food raw materials for the presence of world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 284-288.
- Perry, L., Heard, P., Kane, M., Kim, H., Savikhin, S., Domínguez, W., Applegate, P. (2007). Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *J. Rapid Meth. Aut. Microbiol.* 15: 176-198.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151-156.
- Poli, A., Guglielmini, E., Sembeni, S., Spiazzi, M., Dellaglio, F., Rossi, F., Torriani, S. (2007). Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a protected designation of origin Italian cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 529-534.
- Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L. (2008a). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol. Lett.* 282: 124-131.
- Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Herman, L. (2008b). Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes

from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol. *J. Appl. Microbiol.* 105: 227-235.

R

Rasooly, A., Herold, K.E. (2006). Biosensors for the analysis of food- and waterborne pathogens and their toxins. *J. AOAC Int.* 89: 873-883.

Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., Farmer, J. J. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* 27: 313-320.

Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Witter, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 65: 1372-1370.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Esteve, T., Hoorfar, J., Pla, M. (2003) A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *J. Microbiol. Methods* 54: 381-390.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scotti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J. A., Pla, M. (2004a). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1366-1377.

Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Hugas, M., Pla, M. (2004b). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6299-6301.

- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M., Pla, M. (2005). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of pre-real-time PCR strategies. *J. Food Prot.* 68: 1467-1471.
- Rossen, L., Holmstrom, K., Olsen, J.E., Rasmussen, O.F. (1991). A rapid polymerase chain reaction (PCR) assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 145-152.
- Rossmann, P., Krassnig, M., Wagner, M., Hein, I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res. Microbiol.* 157: 763-771.
- Roucourt, J., Bille, J. (1997) Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.* 50: 67-73.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M., Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1018-1024.
- S**
- Sacchetti, R., Bianucci, F., Ambrogiani, E. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs using chromogenic isolation media. *New Microbiol.* 26: 269-274.
- Schaad, N. W., Cheong, S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., Panopoulos, N. J. (1995). A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Schönenbrücher, V., Mallinson, E.T., Bülte, M. (2008). A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 61-66.



- Seo, K. H., Valentin-Bon, I. E., Brackett, R. E., Holt, P. S. (2004). Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *J. Food Prot.* 67: 864-869. Erratum in: *J. Food Prot.* 2004 67(10)
- Seo, K. H., Valentin-Bon, I. E., Brackett, R. E. (2006). Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in homemade ice cream associated with an outbreak: comparison of conventional and real-time PCR methods. *J. Food Prot.* 69: 639-643.
- Sharma, V. K., Dean-Nystrom, E. A., Casey, T. A. (1999). Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxigenic *E. coli*. *Mol. Cell. Probes.* 13: 291-302
- Sharma, V. K., Carlson, S. A. (2000). Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157: H7 with fluorogenic PCR and single-broth culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5472-5476.
- Sharma, V. K. (2002). Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 65: 1371-1380.
- Silvapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67: 2342-2353.
- Simpkins, S. A., Chan, A. B., Hays, J., Popping B., Cook, N. (2000). An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 75-79.
- Simpson, D.A.C., Feeney, S., Boyle, C., Stitt, A.W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Mol. Vis.* 6: 178-183.
- Spano, G., Beneduce, L., Terzi, V., Stanca, A. M., Massa, S. (2005). Real-time PCR for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy and cattle wastewater. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 164-171.

- Stainer, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A. (1963). The microbial world. 2^a ed. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- Stefan, A., Scaramagli, S., Bergami, R., Mazzini, C., Barbanera, M., Perelle, S., Fach, P. (2007). Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay methods for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in mincemeat samples. *Can. J. Microbiol.* 53: 337-42.
- Steffan, R. J., Atlas, R. M. (1988). DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2185-2191.

T

- Tasara, T., Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptative mechanisms and food safety implications. *J. Food Prot.* 69: 1473-1484.
- Tebbe, C. C., Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2657-2665.
- Trochimchuk, T., Fotheringham, J., Topp, E., Schraft, H., Leung, K. T. (2003). A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157: H7 in cattle manure. *J. Microbiol. Methods* 54: 165-175.
- Tseng, S. Y., Macool, D., Elliot, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M., Amorese, D. (1997). An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*. *Anal. Biochem.* 245: 207-212.
- Tuma, R. S., Beaudet, M. P., Jin, X., Jones, L. J., Cheung, C. -Y, Yue, S., Singer, V. L. (1999). Characterization of SYBR gold nucleic acid gel stain: A dye optimised for use with 300 nm ultraviolet transilluminators. *Anal. Biochem.* 268: 278-288.

V

- Van der Zee, H., Huis in't Veld, J. H. (1997). Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. *J. AOAC Int.* 80: 934-940.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Benal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, J., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 584: 640.
- Vaz-Velho, M., Duarte, G., McLauchlin, J., Gibbs, P. (2001). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from production lines of fresh and cold-smoked fish. *J. Appl. Microbiol.* 91:556-562.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S. (2000). Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromagenic isolation medium. *J. Appl. Microbiol.* 88: 430-441.

W

- Wang, X., Jothikumar, N., Griffiths, M. W. (2004). Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.* 67: 189-192.
- Wang, L., Li, Y., Mustaphai, A. (2007). Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J. Food Prot.* 70: 1366-1372.
- Welti, M., Jaton, K., Altwegg, M., Sahli, R., Wenger, A., Bille, J. (2003). Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* 45: 85-95.

- WHO Regional office for Europe (1999). Food safety. En: Overview of the environment and health in Europe in the 1990s. (<http://www.euro.who.int/document/e66792.pdf>). Copenhagen, pp. 51-52.
- WHO Foodborne diseases, emerging. (2002) Fact sheet N°124
- Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., Torensma, R. B., Kellerand, H. I., Verhoef, J. (1991). Evaluation of a magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* 10: 935-938.
- Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J. AOAC Int.* 85: 524-531.
- Wilson, I.G., (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751.
- Wittwer, C. T., Herrman, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 22: 130-138.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods.* 25: 430-442.
- Wolffs, P. F., Glencross, K., Thibaudeau, R., Griffiths, M.W. (2006). Direct quantitation and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3896-900.
- Wolffs, P.F., Glencross, K., Norling, B., Griffiths, M.W. (2007). Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by flotation and real-time multiplex PCR procedure. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 50-54.

Y

- Yoshitomi, K. J., Jinneman, K. C., Weagant, S. D. (2003). Optimization of a 3'-minor groove binder-DNA probe targeting the *uidA* gene for rapid

identification of *Escherichia coli* O157:H7 using real-time PCR. *Mol. Cell. Probes.* 17: 275-280.

Yoshitomi, K.J., Jinneman, K.C., Weagant, S.D. (2006). Detection of Shiga toxin genes stx1, stx2, and the +93 uidA mutation of *E. coli* O157:H7/H using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes.* 20: 31-41.

Z

Zyskind, J. W., Smith, D. W., (1980) Nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium* origin of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2460-2464.

