



**Universidad de Oviedo**

**Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias**

**Máster en Biomedicina y Oncología Molecular**

**Determinación mediante qRTi-PCR de varios patógenos humanos de transmisión alimentaria.**

**Autor: Beatriz Alonso García**

**Fecha: 13/07/2017**

**Trabajo Fin de Máster**



**D. Felipe Lombó Brugos**, profesor titular del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo

**CERTIFICA:**

Que la Graduada en Biología, Dña. Beatriz Alonso García ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster titulado: “**Determinación mediante qRTi-PCR de varios patógenos humanos de transmisión alimentaria**”, que reúne a mi juicio las condiciones necesarias de originalidad y calidad para ser admitido como Trabajo Fin de Máster de la Universidad de Oviedo

Y para que así conste, firma la presente certificación.

Felipe Lombó Brugos

Oviedo, a 4 de julio de 2017

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
1. Infecciones y toxiinfecciones alimentarias.....	4
2. Impacto sanitario y económico.....	4
3. Microorganismos patógenos de origen alimentario implicados en este trabajo.....	5
1.1. <i>Bacillus cereus</i> .....	5
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	12
4. Métodos de detección de microorganismos patógenos de origen alimentario.....	15
4.1. Detección y recuento mediante técnicas de cultivo.....	16
4.2. Métodos genéticos.....	17
<b>Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>20</b>
1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo.....	20
2. <i>Spiking</i> o contaminación artificial de matrices alimentarias.....	20
3. Detección y recuento mediante técnicas de cultivo.....	21
4. Obtención y manipulación de ADN.....	21
4.1. Extracción de ADN genómico:.....	21
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
5.1. Cebadores.....	22
5.2. PCR cuantitativa a Tiempo Real (qRTi-PCR).....	23
5.3. Elaboración de recta estándar para cuantificación tras la PCR.....	23
<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
1. Ensayo de contaminación artificial de 5 matrices alimentarias y cuantificación de la carga microbiana mediante el método clásico de dilución en placa.....	26
2. Ensayos de inactivación de ADNg procedente de células muertas mediante el agente intercalante EMA.....	29
3. Ensayo de contaminación artificial de 5 matrices alimentarias y cuantificación de la carga microbiana mediante la técnica de qRTi-PCR.....	31
<b>Discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>40</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>41</b>

## Resumen.

Una de las principales causas de enfermedad y mortalidad a nivel mundial son las patologías asociadas a microorganismos, como son las infecciones de origen alimentario. Con el fin de evitar la propagación y el desarrollo de las patologías alimentarias, se han desarrollado métodos para la detección e identificación temprana de los microorganismos patógenos. Los métodos de detección clásicos, como la dilución en placa, han sido útiles durante años, pero presentan limitaciones especialmente en cuanto a la rapidez. La reducción del tiempo de obtención de los resultados es un factor crítico, que repercute en el ámbito económico y el médico-sanitario. Por ello, la introducción de técnicas moleculares, como la qRTi-PCR, ha supuesto un gran avance en el diagnóstico y detección de patógenos de origen alimentario, aumentando la sensibilidad en la detección y reduciendo el tiempo de obtención de los resultados. En este trabajo, se busca la comparación de ambos tipos de métodos, dilución en placa y qRTi-PCR, en 5 tipos de matrices alimentarias contaminadas artificialmente con 3 microorganismos distintos; así como optimizar un protocolo de inactivación del ADNg procedente de las células muertas mediante el empleo del EMA, un pigmento capaz de unirse al ADN e inactivarlo mediante fotoactivación, evitando la amplificación del mismo durante el proceso posterior de qRTi-PCR.

## Introducción.

Las patologías asociadas a microorganismos, en su mayoría bacterias, suponen una de las principales causas de enfermedad y mortalidad a nivel mundial (Wallace *et al.*, 2000). Se puede definir una enfermedad de origen alimentario como: “cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o toxigénica, que es o se piensa que ha sido causada por el agua o los alimentos” (Adams y Motarjemi, 1999).

Por lo tanto, toda infección producida por microorganismos habitual o extraordinariamente presentes en alimentos, o sus toxinas, y siempre que la vía de entrada al organismo sea la entérica, es considerada de origen alimentario.

### 1. Infecciones y toxiinfecciones alimentarias.

Una patología de origen alimentario puede iniciarse de tres formas:

1. Infección. Se requiere la presencia del microorganismo, el cual en cantidades suficientes en el alimento y con las condiciones de crecimiento adecuadas, invade la vía gastrointestinal del hospedador, replicándose y dando lugar a la patología específica. La acción del microorganismo puede ser “no invasiva”, el patógeno coloniza y se multiplica en la superficie del epitelio intestinal; o una forma “invasiva” donde el microorganismo atraviesa la barrera celular del epitelio intestinal, colonizando los tejidos adyacentes (Adams y Motarjemi, 1999).
2. Intoxicación. El crecimiento del microorganismo, en el agua o los alimentos, produce una toxina que al ingerirse causa los signos y síntomas característicos. (Adams y Motarjemi, 1999).
3. Toxiinfección de origen alimentario. Ciertos microorganismos ingresan al tracto gastrointestinal del hospedador y a medida que se replican, forman toxinas que causan las patologías asociadas (Granum, 1997).

### 2. Impacto sanitario y económico.

Aunque las técnicas y los procedimientos de producción, distribución y venta de alimentos, han mejorado con los años, se estima que al año enferman en el mundo unos 600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados y 420.000 mueren por esta causa. Las infecciones diarreicas son las más comúnmente asociadas, haciendo enfermar cada año a unos 550 millones de personas y provocando 230.000 muertes (WHO, 2015).

Debido a la globalización del comercio, patógenos que usualmente han causado enfermedades en ciertas regiones, ahora pueden localizarse en otras en las que nunca antes

se habían reportado, esto ha supuesto la necesidad de introducción de normas y recomendaciones internacionales para garantizar la inocuidad de los alimentos (Hoorfar, 2011). Los métodos de detección de patógenos de uso habitual en el ámbito agroalimentario, han sido útiles durante años, pero presentan limitaciones especialmente en cuanto a la rapidez (Montville *et al.* 2012).

La reducción del tiempo de obtención de los resultados es un factor crítico que repercute en la economía de las industrias agroalimentarias. Además, la detección temprana de un brote alimentario permite limitar su incidencia, evitando su propagación y el aumento del número de casos, facilitando la selección y aplicación del tratamiento más adecuado para el paciente. Por lo que el desarrollo de métodos que den resultados más precisos en tiempos reducidos, supone un logro que aporta beneficios tanto para las empresas del sector agroalimentario, como para el ámbito médico-sanitario.

### 3. Microorganismos patógenos de origen alimentario implicados en este trabajo.

#### 1.1. *Bacillus cereus*.

##### **Taxonomía**

Dominio: *Bacteria*

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacilliaceae*

Género: *Bacillus*

Grupo de especie: grupo de *Bacillus cereus*

Especie: *Bacillus cereus*.

El género *Bacillus*, está formado por un grupo de bacterias esporulantes, Gram positivas, anaerobias facultativas y con bajo contenido G+C, (Griffiths, 2010). Son microorganismos ubicuos, siendo aislados en ambientes diversos (aire, agua dulce y salada, animales, suelo y plantas), y poseyendo una diversidad fenotípica muy elevada lo que ha permitido la

colonización de estos ambientes incluso en condiciones extremas de temperatura, salinidad y acidez (Maughan, 2011).

El género consta de unas 142 especies descritas (Martínez-Blanch, 2008). Dentro del cual se distinguen dos grupos taxonómicos relevantes compuestos por especies con un alto grado de homología en el gen 16S rRNA (Fritze, 2004):

El grupo *Bacillus subtilis*. Incluye a especies como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformes* y *B. pumilus*. (Griffiths, 2010).

El grupo *Bacillus cereus*. Incluye seis especies: *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephaniensis* (Griffiths, 2010; Martínez-Blanch, 2009). Poseen células con un tamaño mayor a 1  $\mu\text{m}$ , esporangios no deformantes y esporas elipsoidales. Poseen la capacidad de producir lecitinasa e incapacidad de fermentar el manitol.

Algunas especies, como *B. cereus*, son mótils, siendo además hemolíticas y penicilina resistentes (Griffiths, 2010; Martínez-Blanch, 2009).

### Morfología y desarrollo

Smith *et al* (1952) y Varnam y Evans (1991) establecieron tres grupos morfológicos:

- **Grupo morfológico 1:** *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformes* y *B. anthracis*. Con esporangios no deformantes o ligeramente deformantes, y con endosporas elipsoidales o cilíndricas, centrales o terminales. Las células de *B. cereus* se presentan con forma de barra alargada, típicamente bacilar, con un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  (Claus y Berkerley, 1986).

- **Grupo morfológico 2:** *B. brevis* y *B. stearothermophilus*. Con esporangios hinchados y endosporas principalmente ovals, pocas veces cilíndricas y centrales, terminales o subterminales.

- **Grupo morfológico 3:** *B. sphaericus* y *B. pasteurii*. Presentan esporas esféricas, subterminales o terminales y esporangios deformantes.

### Cultivo y crecimiento.



Figura 1. Colonias de *B. cereus* cultivadas en Agar Brilliance

Fuente:

[http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1036&c=UK&lang=EN&org=9&img=CM1036C&sec=](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&c=UK&lang=EN&org=9&img=CM1036C&sec=)

En general, las especies del “grupo de *Bacillus cereus*” son microorganismos mesófilos y neutrófilos, Gram positivos, anaerobios facultativos y de reacción positiva al test de Voges-Proskauer (Claus y Bekerley, 1986). En condiciones de laboratorio no requieren de medios complejos para su crecimiento, con un rango de temperatura de entre 30 y 37°C, y fundamentalmente en condiciones aerobias. Para la identificación de *B. cereus*, es común el uso de dos medios de cultivo selectivos: el agar de manitol-yema de huevo-

polimixina (MYP) y el agar de polimixina-piruvato-yema de huevo-manitol (PEMBA), basados en la presencia de lecitinasa y en la incapacidad de *B. cereus* para fermentar manitol (Griffiths, 2010).

En Agar Brilliance, forma colonias de color azul verdoso por la escisión de un sustrato cromogénico incluido en el medio por la enzima  $\beta$ -glucosidasa de *B. cereus* (Figura 1).

### **Virulencia y patogenicidad.**

*B. cereus* es reconocido como agente etiológico de los síndromes emético y diarreico en humanos, producidos por cepas diferentes del mismo patógeno y en los cuales están involucrados varios tipos de toxinas (Griffiths, 2010).

El **síndrome emético** es causado por la cereúlida, un péptido cíclico de síntesis no ribosomal, termo y ácido resistente. Esta toxina está sintetizada por la NRPS codificada por los genes *cesA* y *cesB* del agrupamiento genético de la cereúlida sintetasa (*ces*) (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Este agrupamiento genético es exclusivo de las cepas eméticas de *B. cereus*.

El **síndrome diarreico** es producido por múltiples enterotoxinas, como la hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (NHE) y la citotoxina K (CytK), las cuales son termolábiles, por lo que una preparación adecuada de los alimentos eliminaría el riesgo de intoxicación (Ceuppens *et al.*, 2012). Sin embargo, la intoxicación puede producirse también por la ingestión de células viables del microorganismo que hayan sobrevivido el tracto gastrointestinal y que produzcan la toxina *de novo* en el intestino (Marteau *et al.*, 1997).

### **Epidemiología.**

*B. cereus* puede encontrarse en diversos tipos de alimentos, siendo las pastas y los arroces las matrices en donde con más frecuencia se han detectado las variantes eméticas, mientras que el tipo diarreico se ha asociado a productos lácteos, carnes y vegetales (Granum *et al.*, 1997).

### **Genética y dianas utilizadas para detección.**

*B. cereus* tiene un bajo contenido G+C (35,3%) y un genoma con un tamaño de alrededor de 5,43 Mb (Ivanova *et al.*, 2003). Diversas dianas genéticas se han utilizado tanto para la detección del "grupo de *B. cereus*", como para *B. cereus*, siendo la tendencia general el escoger dianas relacionadas con la producción de las toxinas características de este patógeno.



Santos *et al.*, (2011) usó como diana los genes *ces* (codifican la toxina cereúlida), el que codifica el regulador pleiotrópico *plc*, y los que codifican la toxina diarreica *bceT*, la citotoxina K2 (*cytK*) y la fosfolipasa C (*plcA* o *cerA*). Esta última diana fue la escogida también por Martínez-Blanch *et al.*, (2009) y por Schraft y Griffiths (1995).

### 1.2. *Staphylococcus aureus*.

#### **Taxonomía**

Dominio: *Bacteria*

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Staphylococaceae*

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa y causante de la intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE, SFP en inglés: *staphylococcal food poisoning*). Su nombre proviene del griego *staphylé* = racimo de uvas, *kokkos* = granulado y del latín *aureus* = dorado (Moroni *et al.*, 2010).

El género *Staphylococcus* incluye 35 especies y 17 subespecies, algunas patógenas para el ser humano como *S. aureus* (Argudín, 2011). El género se divide en dos categorías, en función de la acción coagulasa: el grupo de estafilococos coagulasa positivos, con especies como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* y *S. schleiferi*; y el grupo de estafilococos coagulasa negativos, que incluye a un heterogéneo grupo de muchas especies, entre ellas *S. epidermidis* (Seok y Bohach, 2010).

La taxonomía del género ha mejorado en precisión, desde una clasificación basada en morfología y bioquímica, hasta el acceso a métodos genéticos como la PCR, involucrando por ejemplo al gen 16S rRNA, una de las opciones más usadas gracias a su alto grado de conservación en géneros y especies. (Seok y Bohach, 2010).

#### **Morfología.**

Las células tienen forma de coco, de aproximadamente 0,8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, pueden encontrarse aisladas o agrupadas en parejas, tétradas o en forma de racimo irregular (Argudín, 2011). En placas de agar sangre forma colonias grandes, redondas y de color dorado, con halo debido a la hemólisis (Moroni, *et al.*, 2010).

La pared celular está formada en un 50% por péptidoglicano, polisacárido compuesto por largas cadenas de monómeros de ácido N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$ . El resto de la pared está formado mayoritariamente por ácido

teicoico, constituido por polímeros de polirribitol-fosfato, unidos a los residuos de ácido N-acetil-murámico del péptidoglicano (Deininger *et al.*, 2003).

Por otra parte, están los ácidos lipoteicoicos (LTAs) de la membrana plasmática, con una estructura similar a la del ácido teicoico salvo que contienen poliglicerol fosfato, y están unidos a residuos de glicerol que sirven como anclas en la membrana plasmática. Están implicados en procesos inflamatorios, ya que disparan la salida de citoquinas de los macrófagos y otros componentes de sistema inmune (Deininger *et al.*, 2003).

### **Cultivo y crecimiento.**

*S. aureus* es anaerobio facultativo, no esporulante, no mótil, mesófilo, y con crecimiento en un rango de temperatura de los 7 a los 48°C, con un intervalo óptimo de 35 a 40°C. El pH idóneo es 7 pero es capaz de crecer en el intervalo de 4 a 8. Posee una alta tolerancia a la salinidad, soportando concentraciones de hasta 20%. Puede crecer en alimentos con una  $a_w =$

0,86, con un valor óptimo de 0,94 (Moroni *et al.*, 2010).

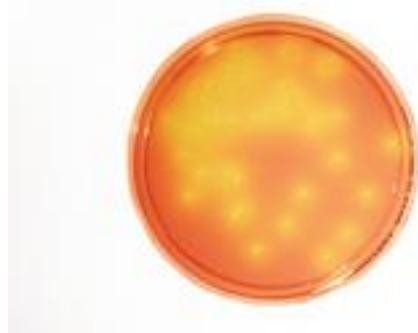


Figura 2. Colonias de *S. aureus* cultivadas en Agar Sal Manitol.

Fuente:

[https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Mannitol-Salt-Agar--LI-30ml,MDA\\_CHEM-146023?RefererURL=https%3A%2F%2Fes.search.yahoo.com%2F&bd=1](https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Mannitol-Salt-Agar--LI-30ml,MDA_CHEM-146023?RefererURL=https%3A%2F%2Fes.search.yahoo.com%2F&bd=1)

Uno de los medios de cultivo más difundidos para el aislamiento y recuento de *S. aureus* y otros estafilococos catalasa positivos es el de Baird-Parker, el cual contiene en su composición telurito potásico que otorga el color marrón-negro característico con su precipitación, y yema de huevo cuya lipólisis induce la formación de un halo alrededor de la colonia.

En Agar Sal Manitol genera colonias amarillas rodeadas de halo amarillo por fermentación del manitol y posterior acidificación del medio (cambia el color del indicador de pH). (Figura 2)

### **Patogenicidad y Factores de virulencia.**

*S. aureus* es un patógeno humano que reviste gran peligrosidad ya que es el agente etiológico de una amplia variedad de infecciones adquiridas tanto en el ámbito comunitario, como de origen hospitalario o nosocomial (Bien *et al.*, 2011). La que presenta mayor implicación para la higiene y seguridad alimentaria es la intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE), debido

a la contaminación de los alimentos con una o más de las enterotoxinas de *S. aureus* (Dinges *et al.*, 2000).

Las patologías causadas pueden clasificarse en tres grupos: lesiones superficiales, como heridas infectadas; intoxicaciones, como las de origen alimentario, el síndrome de la piel escaldada o de Ritter, y el síndrome del shock tóxico; y enfermedades sistémicas y condiciones potencialmente mortales como endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemias (Aires de Sousa y De Lencastre, 2004).

La gran variedad de patologías se debe al gran número de factores de virulencia que presenta, que promueven la colonización y el daño tisular, la invasión celular o la producción de toxinas (Dinges *et al.*, 2000). La composición de la pared celular, la cápsula, y la producción de exoproteínas, determinan la virulencia. La pared celular además de péptidoglicano y ácido teicoico, también presenta diversas proteínas que facilitan la unión entre *S. aureus* a la célula hospedadora. Clarke *et al.*, (2006) describen un tipo de proteína de superficie de la pared celular de *S. aureus*, que se une a las células del hospedador y que recibe el nombre de “componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz celular” o MSCRAMMs. Se unen covalentemente al péptidoglicano de la pared celular (Foster *et al.*, 1998). MSCRAMMs típicas en este microorganismo son la proteína estafilocócica A (SpA), las proteínas de unión a fibronectina A y B (FnbpA y FnbpB) y los factores proteínicos de aglutinación A y B (Bien *et al.*, 2011).

La cápsula de *S. aureus*, presente la mayoría de los casos, está formada por polisacáridos de los que se han identificado 11 tipos, siendo los tipos 5 y 8 los más frecuentemente implicados en infecciones humanas, con el 75% de los casos clínicos (Que y Moreillon, 2010).

Casi todas las cepas secretan exoproteínas (nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas, colagenasas y exotoxinas) que facilitan la obtención de nutrientes para su desarrollo a partir del tejido infectado (Dinges *et al.*, 2000). También presenta enzimas que promueven la invasión tisular como la estafiloquinasa, la hialuronidasa o las lipasas, con funciones de destrucción de coágulos, degradación del ácido hialurónico de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, o hidrólisis de lípidos respectivamente. (Argudin, 2011).

*S. aureus* posee una enzima coagulasa que puede encontrarse libre en el citoplasma, y otra ligada a la pared celular. La acción de ambas, media la formación de una capa de fibrina que rodea el absceso infeccioso protegiendo al patógeno de la fagocitosis (Que y Moreillon, 2010).

En cuanto a las toxinas, *S. aureus* es capaz de producir una amplia variedad que actúan de varias formas sobre el hospedador. Se diferencian dos tipos generales:

1. Las citotoxinas. En este grupo se encuentran hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ , con acciones citotóxicas creando poros en la membrana plasmática, generando la pérdida del contenido celular y la lisis de distintos tipos celulares (Foster, 2005).
2. Los superantígenos, toxinas pirogénicas o PSTAGs, donde se incluyen las enterotoxinas A, B, C, D, las exfoliatinas A y B y la TSST-1, cuya característica primordial es la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T. Son las causantes del síndrome del shock tóxico estafilocócico y de las intoxicaciones alimentarias.

Las enterotoxinas de *S. aureus* (SEs) se sintetizan durante el tránsito de la fase exponencial hacia la fase estacionaria del crecimiento de esta bacteria, siendo resistentes a condiciones de bajo pH y altas temperaturas y a la acción de proteasas, lo que hace que sean capaces de soportar tratamiento de calor en la preparación de alimentos y de sobrevivir en el tracto gastrointestinal, causando intoxicaciones alimentarias (Betley *et al.*, 1992). Su producción está mediada por factores ambientales tales como temperatura, pH y condiciones osmóticas. (Pereira *et al.*, 1982).

### **Epidemiología.**

*S. aureus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, es un colonizador habitual de la piel y las mucosas de casi todos los animales (Götz *et al.*, 2006). El ser humano es un reservorio natural de *S. aureus*, siendo portadores persistentes o temporales entre un 30 y un 50% de los individuos sanos de la población adulta, hecho que incrementa el riesgo de padecer infecciones subsecuentes (Wenzel y Per, 1995).

La contaminación alimentaria suele deberse a la transmisión del patógeno a partir de manipuladores de alimentos portadores de *S. aureus* en sus fosas nasales o en sus manos, (Kluytmans *et al.*, 2005). Un manejo inadecuado de los alimentos, con medidas inadecuadas o ineficientes de higiene y unas condiciones de almacenamiento que favorezcan el

crecimiento del microorganismo y la producción de toxinas, dan lugar al brote infeccioso (Argudín, 2010).

*S. aureus* puede estar presente en gran variedad de alimentos como carnes y subproductos, aves de corral y huevos, leche y sus derivados, ensaladas, productos de pastelería, salsas, pastas y patés (Wieneke *et al.*, 1993).

### **Genética y dianas utilizadas para detección.**

El genoma de *S. aureus* consiste en un cromosoma circular de aproximadamente 2,8 hasta 3,0 Mb, con una media de 33% de G+C, 2.900 genes y cerca de 2.800 proteínas. Posee además profagos, plásmidos y transposones, pudiendo encontrar los genes que dirigen la virulencia y la resistencia a antibióticos en el cromosoma o en elementos extracromosómicos (Lowy, 1998; NCBI Genoma, 2012).

Debido a las limitaciones que presenta la detección de *S. aureus* por métodos microbiológicos clásicos, como son la baja sensibilidad de las técnicas, o la poca prevalencia del patógeno, se han desarrollado métodos de detección de carácter molecular como son la PCR convencional, la mPCR y la qRTi-PCR (Moroni *et al.*, 2010). Para la aplicación de estos métodos se han seleccionado genes asociados a factores de virulencia, como toxinas y enzimas, y otros no asociados a virulencia, como el 16S rRNA o el 23S rRNA.

El gen *coa*, que codifica la enzima estafilocoagulasa (o simplemente coagulasa), es usado como diana de detección para *S. aureus*.

#### *1.3. Escherichia coli.*

##### **Taxonomía**

Dominio: *Bacteria*

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un microorganismo de uso frecuente en laboratorios de todo el mundo, que ha servido de modelo y vehículo para el estudio de diversos aspectos de la vida bacteriana (Neidhardt, 1996).

El género se compone de cinco especies reconocidas en el manual de Bergley de sistemática: *E.coli*, *E. hermannii*, *E.fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae* (Scheutz y Strockbine, 2005). Adicionalmente, en la literatura se encuentran referencias para otras dos especies: *E. senegalensis*, y *E. albertii* (Huys *et al.*, 2005).

*E. coli* forma parte de la microbiota indígena del intestino de humanos y animales, habitualmente comensal, pero ciertas cepas tienen actividad patogénica, originando cuadros diarreicos e infecciones extraintestinales (Chaudhuri y Henderson, 2012).

*E. coli* es una bacteria Gram-negativa, descrita en 1885 por Theodor Escherich como *Bacterium coli commune*, asignándosele posteriormente el nombre de su descubridor (Beuchamp y Soros, 2010).

Taxonómicamente, se puede hacer una clasificación entre las cepas de *E. coli* en función de su patogenicidad. De esta forma, se establece un primer grupo sin patogenicidad alguna, y un segundo grupo en el cual se encuentran aquellas cepas patógenas al hombre o los animales.

Dentro del grupo de cepas patógenas de *E. coli*, se encuentran diversas serovariantes asociadas a distintos cuadros de carácter entérico, como son: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente-enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Beuchamp y Soros, 2010) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC). Adicionalmente existen variantes extraintestinales, que dan lugar a patologías no asociadas al tracto gastrointestinal: *E. coli* uropatogénica (UPEC) y la *E. coli* causante de meningitis neonatales (NMEC) (Croxen y Finlay, 2010).

### **Morfología.**

Son células de morfología bacilar, rectas, cilíndricas y con extremos romos. Tienen una longitud que va desde los 2 a 6  $\mu\text{m}$  y un diámetro de entre 1,1, y 1,5  $\mu\text{m}$ . Pueden encontrarse de forma individual, o agrupadas a pares. Poseen de 5 a 10 flagelos peritricos por célula y, en consecuencia, motilidad (Scheutz y Strockbine, 2005).

Muchas células presentan fimbrias, dispuestas aleatoriamente sobre la superficie celular, observándose distintos tipos en las diferentes cepas (Scheutz y Strockbine, 2005).

La pared celular está conformada principalmente por péptidoglicano, compuesto por la N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetil-murámico, y por péptidos como L-alanina, ácido D-glutámico, ácido L-mesodiaminopimélico y D-alanina (Park, 1996).

La membrana externa, contiene más de un millón de moléculas de lipolisacárido (LPS), compuesto por tres dominios unidos covalentemente: el lípido A, que es parte de una

endotoxina característica de las bacterias Gram negativas (Raetz *et al.*, 2002); la región nuclear de los oligosacáridos fosforilados no repetitivos; y el antígeno O (Scheutz y Strockbine, 2005).

### **Cultivo y crecimiento.**



Figura 3. Colonias de *E. coli* cultivo en VRBLA.

Fuente:

<http://www.eolabs.com/product/pp1150-violet-red-bile-agar/>

granate (Figura 3).

*E. coli* es anaerobio facultativo, con crecimiento en intervalos de temperaturas desde los 15 a los 45°C, siendo el óptimo entre 21 y 37°C. El pH óptimo está entre 5 y 9 (Ingraham y Marr, 1996). Es cultivable con facilidad en el laboratorio, en medios de cultivo como NA o TSA. La identificación y selección es posible en medios formulados con ese fin, como el medio EMB (Levine, 1921), donde *E. coli* forma colonias aisladas de entre 2 y 3 mm con tendencia al crecimiento confluyente y de color verde metálico, o en VRBLA, donde sus colonias son de color

### **Patogenicidad y Factores de virulencia.**

Los distintos serotipos patógenos de *E. coli* son causantes de diferentes patologías, fundamentalmente de naturaleza entérica, las cuales varían en las formas de manifestación, la intensidad de los síntomas y su gravedad. Asimismo, los mecanismos de virulencia varían también en relación a la variedad causante de la infección (Beauchamp y Soros, 2010).

Estos factores de virulencia solo han sido identificados en variantes patógenas de este microorganismo, y se encuentran localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos, formando clústeres o islas de patogenicidad (IPs) (Croxen y Finlay, 2010).

El serotipo O157:H7 es el que más comúnmente se ve involucrado en brotes de esta variante (Croxen y Finlay, 2010). Prácticamente todas las cepas EHEC portan el plásmido pO157, que codifica numerosos factores de virulencia, siendo el más característico de las EHEC el que codifica las llamadas verocitotoxinas o toxinas de Shiga (Piérard *et al.*, 2012).

Existen dos subtipos de toxinas de Shiga, la Stx1 y la Stx2, que pueden presentarse juntas o por separado en las diferentes cepas que las producen, siendo la Stx2 la más abundante en casos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemorrágico (Nataro y Kaper, 1998).

## **Epidemiología.**

*E. coli* es un microorganismo ubicuo, pudiendo encontrarse en muchos nichos o estados ambientales, así como formando parte de la microbiota endógena de muchos seres vivos, siendo usualmente no patógeno (Nataro y Kaper, 1998).

Las heces de los animales son la principal fuente de contaminación por *E.coli* del agua, suelo y objetos. Esto favorece que los alimentos crudos, el agua de procesos, los equipamientos, trabajadores y manipuladores, sean fácilmente contaminados por este microorganismo. (Scanga, 2005).

## **Genética y dianas utilizadas para detección.**

La secuencia completa del genoma de *E.coli* O157:H7 indica que este microorganismo posee un cromosoma circular de aproximadamente 5,5 Mb de longitud, un plásmido de virulencia (pO157) de 92,7 Kb y un plásmido críptico de 3,3 Kb (pOSAK1) (Hayashi *et al.*, 2001).

El cromosoma presenta 5.361 genes codificadores de proteínas, 7 conjuntos de RNAs (16S, 23S y 5S rRNA), 102 tRNAs, 1 tmRNA y al menos 13 pequeños RNAs, incluyendo RNAsa P, 6S RNA y 4,5S RNA. Tiene un contenido de G+C de 50,5%. Se han identificado además diversos elementos móviles como 20 secuencias de inserción (IS) y 18 profagos (Hayashi *et al.*, 2001).

Se han empleado diversas dianas para la detección de las variantes patógenas de *E. coli*, los genes usados habitualmente, suelen estar asociados a factores de virulencia como la producción de toxinas, como el caso de *stx*, *hlyA*; a factores de carácter vegetativo como *uidA*, 16S rRNA o a elementos móviles como secuencias de inserción.

### **4. Métodos de detección de microorganismos patógenos de origen alimentario.**

Los microorganismos asociados a los alimentos están ampliamente distribuidos en el ambiente por lo que se deben tomar las medidas de higiene y seguridad en la producción, elaboración y manipulación de los alimentos y sus componentes para reducir la probabilidad de que los microorganismos patógenos lleguen al consumidor (Hoorfar, 2011).

Las consecuencias de un brote infeccioso de origen alimentario van más allá de la salud de una parte de la población, ya que estos eventos generan pérdidas económicas importantes al sector agroalimentario. Además, representan un elevado coste para los sistemas sanitarios de las regiones donde ocurren (Stopforth *et al.*, 2010).



Para evitar el desarrollo y la propagación de patologías alimentarias, se ha hecho necesario el desarrollo y aplicación de métodos para la detección e identificación temprana de los microorganismos patógenos. Estos métodos permiten la identificación del agente etiológico específico del cuadro clínico manifestado por los pacientes durante un brote epidémico, permitiendo así la aplicación eficaz del tratamiento (Love y Jones, 2008).

#### 4.1. Detección y recuento mediante técnicas de cultivo.

Basadas en la detección y recuento de los patógenos mediante su siembra en diferentes medios de cultivo y su incubado a temperaturas y condiciones específicas. En función de la técnica, se utilizan medios de cultivo no selectivos, selectivos o diferenciales (Yousef, 2008).

En ocasiones se requiere conocer el número de células viables del mismo. En microbiología clásica, la técnica de recuento se basa en el concepto de las unidades formadoras de colonias (UFCs), el cual asume que cada célula viable en la muestra es capaz de formar una colonia en el medio de cultivo en el que se siembre (Montville *et al.*, 2012).

Bajo esta premisa, se preparan diluciones decimales de un cultivo inicial, y estas se siembran en toda la superficie de la placa de medio sólido, para luego incubar a la temperatura adecuada por 24 h. Transcurrido este tiempo, se cuentan las colonias presentes en las placas de cada dilución y se multiplica el valor obtenido por el factor de dilución correspondiente, obteniéndose así el número de UFC presentes.

Inicialmente este método ha sido diseñado para el recuento de bacterias aerobias, capaces de crecer a una temperatura de entre 30 y 37°C, pero es posible adaptarlo a los requerimientos de anaerobios, mediante la modificación de la atmósfera de incubación. Esta técnica tiene importantes limitaciones: la premisa de cada colonia obtenida en la placa de agar proviene de una única colonia (UFC), no es del todo cierta, ya que no siempre las células del microorganismo se encuentran como unidades libres, pueden estar formando agrupaciones de 10, 20 o 100 células que dan lugar a una única colonia (Montville y Matthews *et al.*, 2012).

Por otra parte, el recuento se recomienda para muestras líquidas con más de 250 UFC/mL y sólidas con más de 2.500 UFC/mL, de tal forma que microorganismos con una baja carga en la muestra no serían detectados (Montville y Matthews *et al.*, 2012). Esto es especialmente peligroso en los casos de patógenos con una dosis mínima infectiva relativamente baja.

Estos métodos requieren bastante preparación previa, tanto de las muestras como de los medios necesarios, los cuales, para disminuir la probabilidad de contaminación, deben prepararse para el análisis de un lote de muestras. Además, muchos requieren tiempos de incubación prolongados y ensayos posteriores de naturaleza bioquímica, lo que se traduce en lotes de alimentos inmovilizados y pérdidas económicas para el sector agroalimentario.

#### 4.2. Métodos genéticos.

La aplicación de técnicas moleculares, en especial las orientadas a la detección de secuencias de ADN o ARN, ha supuesto un gran avance en el diagnóstico y detección de patógenos de origen alimentario (Glynn, 2008). La rápida expansión de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987), ha llevado a la búsqueda de nuevas aplicaciones, acercando las nuevas tecnologías a la seguridad alimentaria (Gorski y Csordas, 2010).

Los avances conseguidos han permitido el aumento de la sensibilidad en la detección y la posibilidad de cuantificar el número de patógenos presentes en una muestra, prescindiendo de los métodos clásicos, y reduciendo el tiempo de obtención de resultados (Levin, 2010).

##### 4.2.1. PCR cuantitativa a tiempo real o qRTi-PCR.

La qRTi-PCR es una alternativa rápida y bastante fiable, para la obtención de datos cuantitativos de una muestra, capaz de arrojar datos en un tiempo relativamente corto. Basada en la detección de la emisión de fluorescencia generada durante la amplificación de una diana y emitida por la excitación de un fluoróforo (Levin, 2010). La intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de amplicones obtenida en cada ciclo, de esta forma, si se elabora una recta estándar de cuantificación, con patrones de ADN de concentración conocida, es posible interpolar estos valores y calcular el número de copias presentes de la diana (Shiple, 2006).

El mecanismo por el que se produce la señal es dependiente del sistema seleccionado para la emisión de fluorescencia. Estos pueden ser inespecíficos: como el agente intercalante fluorescencia SYBR Green (Applied Biosystems); o específicos, como las *molecular beacons* (Agilent Technologies) o las sondas TaqMan (Applied Biosystems) (Phillips, 2009).

Las sondas de hidrólisis o TaqMan, descritas por primera vez en 1991 por Holland *et al.*, utilizan la actividad 5' exonucleasa de la *Taq*-polimerasa para inducir la emisión de fluorescencia. Son secuencias oligonucleotídicas con un fluoróforo (*reporter*) enlazado a un

extremo y un *quencher* al otro, de tal forma que la fluorescencia del primero es absorbida por el segundo cuando ambos están presentes cerca, en una misma molécula. Estas sondas, además hibridan por su zona central específicamente sobre una secuencia del gen de interés a amplificar, situada entre los sitios de anillamiento de un par de cebadores seleccionados. La hidrólisis se produce por la acción exonucleasa de la *Taq*-polimerasa una vez que ésta sintetiza la nueva cadena durante la PCR (Levin, 2010).

Al producirse la hibridación de la sonda, y su hidrólisis, el *reporter* y el *quencher* quedan separados en dos fragmentos independientes. Así, producida la amplificación del gen diana, el *reporter* es liberado por la ADN polimerasa, emitiendo una gran fluorescencia, que crece exponencialmente a medida que avanzan los ciclos de la reacción (Shiple, 2006).

A la hora de elegir el tipo de sistema el cual operaría la qRTi-PCR a realizar, se deben tener en cuenta las ventajas y desventajas de cada método, los ensayos con sondas TaqMan requieren el uso de reactivos específicos y polimerasas estandarizadas y optimizadas, por lo que la opción de personalizar las mezclas no suele ser adecuada. Se recomienda la adquisición de mezclas maestras (*master mixes*) comerciales, las cuales no son especialmente económicas, pero garantizan mejores resultados. Además, la síntesis de la sonda misma tiene un coste elevado en comparación al de otros sistemas de fluorescencia (Bustin y Nolan, 2009).

#### 4.2.2. Bromuro de etidio monoazida (EMA).

El EMA es un pigmento fluorescente, empleado para la discriminación entre células viables y células muertas, ya que por acción de la luz visible se produce su unión covalente al ADN en las células muertas, un proceso que no ocurre en células vivas, ya que en éstas no es capaz de penetrar al interior celular al poseer una membrana y pared intactas estructuralmente (Ping Wu, G. *et al.*, 2015).

Tras la fotoactivación, el EMA se convierte en un radical nitreno, el cual se une de forma irreversible al ADN cromosómico mediante enlaces covalentes, causando una inhibición de la amplificación del ADN (Minami, J. *et al.*, 2010).

## Objetivos.

Los objetivos a desarrollar en este Trabajo Fin de Máster han sido:

- Optimizar un protocolo de inactivación de ADNg procedente de células muertas mediante el agente intercalante del ADN EMA.
- Comparar la cuantificación de la carga microbiana en 5 matrices alimentarias mediante ensayos de dilución en placa y qRTi-PCR.

## Material y Métodos.

### 1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo.

Se han empleado un total de 3 microorganismos que pueden encontrarse en matrices alimentarias y en el ambiente, pudiendo dar lugar a enfermedades de origen alimentario.

En la siguiente tabla (*Tabla 1*), se mencionan los diferentes microorganismos, así como los medios de cultivo selectivos empleados para su detección e identificación para el estudio.

Cepa	Medio de Cultivo	Temperatura (°C)	[O <sub>2</sub> ]
<i>Bacillus cereus</i> CECT 131	Brilliance Agar <i>B. cereus</i>	37°	Aerobio
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 240	Agar Sal Manitol	37°	Aerobio
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (EHEC) CECT 4267	Agar lactosa rojo-violeta con sales biliares (VRBLA)	37°	Aerobio

Tabla 1. Medios utilizados para el cultivo y la identificación de microorganismos patógenos de origen alimentario.

La manipulación de todas las cepas, tanto para su recuperación a partir de liofilizados o microorganismos conservados en glicerol, así como para su cultivo sucesivo, se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar de bioseguridad nivel II Telstar BioIIA.

La incubación de los cultivos se llevó a cabo en estufas Memmert INE500 de temperatura graduable.

### 2. *Spiking* o contaminación artificial de matrices alimentarias.

El día anterior al *spiking*, se preparó un preinóculo del microorganismo correspondiente a partir de una colonia aislada obtenida de una placa de cultivo. Se incubó durante una noche a 37°C y 300 rpm en medio líquido. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se calculó la concentración de microorganismos presentes en el preinóculo y se diluyó con medio de cultivo líquido hasta obtener una densidad celular de 3 millones de UFCs/mL.

Las matrices alimentarias usadas fueron: salchicha, como producto cárnico; fabada, como alimento procesado; sardina, como producto de la pesca; bizcocho, como producto pastelero; y leche en polvo, como producto lácteo.

Para la contaminación artificial de matrices alimentarias se inocularon alícuotas de 10 gramos de los 5 tipos de matrices alimentarias, añadiendo medio Ringer hasta alcanzar los 100 gramos, medidos en una balanza de laboratorio MXX-061 (Denver Instrument). Cada alícuota

se introdujo de modo aséptico en una bolsa para muestras con filtro WHIRL-PAK BO1195WA (Nasco).

La muestra se homogenizó en un Stomacher 80 (Seward), por 60 s a alta velocidad. Tras ello, se inoculó cada bolsa con  $3 \times 10^6$  UFCs del microorganismo correspondiente y se volvió a homogenizar cada bolsa con el Stomacher durante 30 s. Se realizaron quintuplicados de cada matriz para cada microorganismo.

### 3. Detección y recuento mediante técnicas de cultivo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se emplearon medios de cultivos selectivos y diferenciales para la detección y recuento de los microorganismos.

Para llevarlo a cabo, se realizaron los siguientes pasos:

1. Extracción de alícuotas de 1 mL de cada cultivo (matriz alimentaria + microorganismo) obteniendo 25 alícuotas en total.
2. Se prepararon 3 diluciones seriadas a partir de la alícuota de 1 mL, diluyendo la muestra en medio Ringer.
3. Siembra de 100µL de cada alícuota en las placas de medio de cultivo, con ayuda de un asa de siembra (pipeta Pasteur), realizando duplicados de cada dilución.
4. Incubación de las placas durante 24 h, con las condiciones de temperatura y oxígeno adecuadas para el crecimiento del microorganismo.
5. Recuento de las unidades formadoras de colonias (UFCs) en cada placa, a partir de la dilución adecuada.

### 4. Obtención y manipulación de ADN.

#### 4.1. Extracción de ADN genómico:

- 4.1.1. A partir de cultivos puros de las cepas microbianas.

Para realizar las rectas patrón de cada microorganismo necesarias para la qRTi-PCR, a partir de cultivos en medio líquido de una noche de cada microorganismo, se extrajo ADN mediante el Kit de Purificación de ADN Genómico Gene JET (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo incluido en el mismo kit, tanto para Gram-positivas como para Gram-negativas. Las muestras una vez extraído el ADN, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 4.1.2. A partir de matrices alimentarias contaminadas artificialmente:

Para la extracción de ADN, en este caso, se extrajo 1 mL adicional de cada bolsa de filtro WHIRL-PAK BO1195WA (Nasco), a partir de los diferentes *spikings* de los 5 tipos de matrices alimentarias.

Estas muestras bacterianas se trataron en primer lugar con monoazida de etidio (EMA), preparada a una concentración stock de 5 mg/mL en N,N-dimetil-formamida. Este paso se realizó antes del empleo del kit de extracción de ADN, con el objetivo de discriminar entre ADNg procedente de células viables y de no viables en las reacciones de qRTi-PCR ya que el EMA atraviesa la pared de las células muertas y se une al ADNg inutilizándolo.

El tratamiento con EMA se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- a) Dispensar alícuotas de 1 mL del cultivo.
- b) Tapar los tubos con papel de aluminio y añadir 1,5  $\mu$ L de EMA/tubo desde una solución a 5 mg/mL.
- c) Incubar durante 10 min en oscuridad, colocando los tubos en un agitador cubierto con papel de aluminio y agitando a 300 rpm.
- d) Exponer las muestras a la luz de una lámpara de 500 W, a una distancia de 20 cm y durante 10 min. Cada 2 min se permite que las muestras enfríen en hielo durante otros 2 min. La lámpara se debe colocar perpendicularmente.

Tras ello se realiza la extracción de ADN genómico según el protocolo del kit comercial Kit de Purificación de ADN Genómico Gene JET (Thermo Scientific) según corresponda, Gram-positivas o Gram-negativas.

## 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### 5.1. Cebadores.

Se han utilizado parejas de cebadores diseñados previamente en el laboratorio BIONUC, con el objetivo de amplificar una diana genética específica para cada microorganismo.

Las dianas (*Tabla 2*) se corresponden con genes con alto grado de conservación en la especie tratada, evitando así la posibilidad de variaciones entre serovariedades o cepas del microorganismo correspondiente. Las dianas también se eligieron de forma que no existiesen en otras especies emparentadas.

Microorganismo	Siglas	Gen diana	Número de acceso
<i>B. cereus</i>	BC	<i>cerB</i>	M24149
<i>E. coli</i>	EC	<i>uidA</i>	EOX2196.1
<i>S. aureus</i>	SA	<i>coa</i>	CA36434,1

Tabla 2. Dianas genéticas seleccionadas para la cuantificación por qRTi-PCR y sus números de acceso en GenBank, para cada uno de los patógenos utilizados en este trabajo.

Todas las parejas de cebadores (Tabla 3) y sondas TaqMan (Tabla 4) fueron diseñadas previamente en el laboratorio BIONUC.

Microorganismo	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)
<i>B. cereus</i>	GVR-BC-Mpx-up	GGTCGTAGTAGTGGAAGCGAATG	60°C
	GVR-BC-Mpx-rp	AACGTTAGGAACTATTCATC	
<i>E. coli</i>	GVR-EC-Mpx-up	TGGTGATTACCGACGAAAACG	
	GVR-EC-Mpx-rp	CCGGCGTAGTTAAAGAAATCATG	
<i>S. aureus</i>	GVR-SA-Mpx-up	CCGCAATTTAACAAAACACC	
	GVR-SA-Mpx-up	TGGTCTCGCTTCATATCCAA	

Tabla 3. Parejas de cebadores usados en qRTi-PCR.

Microorganismo	Sonda	Secuencia (5' - 3')	Fluoróforo	Tm (°C)
<i>B. cereus</i>	TaqMan-GVR-BC2	AACGTTAGGAACTATTCATC	VIC	60
<i>E. coli</i>	TaqMan-GVR-EC	CAAGAAAAAGCAGTCTTAC	NED	
<i>S. aureus</i>	TaqMan-GVR-SA	CGTGAATACAACGATGGAACA	FAM	

Tabla 4. Sondas utilizadas en qRTi-PCR.

### 5.2. PCR cuantitativa a Tiempo Real (qRTi-PCR).

Para estos ensayos se usaron tres sondas TaqMan cuyos fluoróforos eran NED, VIC y 6-FAM, empleando el termociclador HT7900 Real Time PCR (Applied Biosystems) de la Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Para el análisis de los resultados se usó la aplicación informática 7900 HT Sequence Detection Systems (SDS) versión 2.3 de Applied Biosystems.

En todos los ensayos se utilizó la mezcla comercial (*master mix*) de reacción TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), la cual contiene la enzima ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato, tampón de reacción, Mg<sup>2+</sup> y además el fluoróforo ROX como referencia interna.

### 5.3. Elaboración de recta estándar para cuantificación tras la PCR.

Para la cuantificación del número de copias de cada diana genética presente en las muestras de los tres microorganismos utilizados en estos experimentos, se elaboraron rectas estándar de cuantificación en cada grupo de reacciones. Para ello, se prepararon cultivos estándar de cada microorganismo, midiendo la absorbancia a 600 nm de longitud de onda, calculándose así el número de UFCs presentes mediante las correspondientes curvas de crecimiento



previamente elaboradas. A partir de estos cultivos, se extrajo el ADN con el kit comercial previamente especificado.

Una vez extraído el ADNg, se calculó el número de genomas equivalentes (GEs/ $\mu$ L) presente en cada muestra, midiendo la absorbancia a 260 nm de longitud de onda por medio de un Nanodrop 2000/2000c UV-Vis (ThermoFisher Scientific).

Para calcular el número de GEs, se calculó en primer lugar la masa en picogramos (pg) de un genoma a partir de la siguiente fórmula:  $masa\ en\ pg\ de\ 1\ GE = \frac{genoma\ (pb)}{0,978 \times 10^9}$ . Una vez calculados los pg de 1 GE de cada microorganismo, con la medida obtenida en el Nanodrop se obtuvo el número de Ges que contenía cada muestra de ADNg por  $\mu$ L. Tras ello, se realizaron diluciones seriadas decimales, desde  $10^6$  hasta 100 GEs, para realizar la recta patrón incluida en la placa de microtiter con las reacciones de qRTi-PCR.

Una vez extraído el ADNg, se llevó a cabo la qRTi-PCR, y con el software de análisis correspondiente al equipo de qRTi-PCR, se calculó cómo de óptima era la recta patrón obtenida con las muestras diluidas de ADNg con número de GEs conocidos. Sólo se dieron por válidos los experimentos de qRTi-PCR que mostraron un valor para sus rectas patrón de  $R^2 \geq 0,98$ .

Las diferentes etapas de cada reacción de qRTi-PCR se muestran en la *Tabla 5*.

Paso	Temperatura	Duración	Repeticiones
Desnaturalización/activación polimerasa	50°C	120 s	1
	95°C	600s	1
Desnaturalización	95°C	15s	40 ciclos
Anillamiento	60°C	60s	

*Tabla 5.* Condiciones de amplificación para muestras a cuantificar por qRTi-PCR uniplex.

En cada reacción de qRTi-PCR se analizaron 25 muestras (5 muestras por cada matriz alimentaria), se introdujeron pocillos como control negativo de amplificación, sin ADNg, donde se no observó amplificación alguna y, además, se incluyeron las muestras que contenían las diluciones seriadas decimales para realizar la recta patrón (*Tabla 6*).

Componente	Volumen (1 reacción)	Concentraciones iniciales	Concentraciones finales
Master Mix	12,5 $\mu$ L	2X	1X
Oligonucleótido Up	1,125 $\mu$ L	20 $\mu$ M	0,9 $\mu$ M
Oligonucleótido Rp	1,125 $\mu$ L	20 $\mu$ M	0,9 $\mu$ M

<b>Sonda TaqMan</b>	0,0625 $\mu$ L	2,5 mM	0,05 $\mu$ M
<b>ADN genómico</b>	10,2 $\mu$ L	-	-
<b>TOTAL MIX</b>	25 $\mu$ L		

Tabla 6. Componentes de la reacción de qRTi-PCR.

## Resultados.

### 1. Ensayo de contaminación artificial de 5 matrices alimentarias y cuantificación de la carga microbiana mediante el método clásico de dilución en placa.

Se llevó a cabo la contaminación de 10 g de cada una de las 5 matrices alimentarias (*spiking*) por quintuplicado a partir de un preinóculo inicial del microorganismo correspondiente que había sido cultivado durante 24 h en agitación, y que se cuantificó en UFCs/mL tras ésta incubación.

Se inocularon  $3 \times 10^6$  UFCs de cada microorganismo en cada bolsa con filtro WHIRL-PAK BO1195WA (Nasco) que contenía los 10 g de la matriz alimentaria correspondiente, tras su homogenización, en un volumen final de 100 mL (30.000 UFCs/mL).

Tras el *spiking* se extrajo 1 mL de cada bolsa de la solución, y se llevaron a cabo tres diluciones seriadas para posteriormente proceder a la siembra en placa.

Se sembraron 100  $\mu$ L de cada dilución en cada placa, realizándose duplicados de cada dilución. Al hacer posteriormente el recuento de UFCs, se tienen en cuenta estos 100  $\mu$ L inoculados, por lo que el resultado se debe multiplicar por 10 y aplicar también un factor de corrección atendiendo a la dilución sobre la cual se aplique el recuento, para lograr UFCs/mL.

En el caso de *B. cereus*, como se observa en la *Tabla 7*, el número de UFCs/mL fue siempre muy similar a los  $3 \times 10^4$  UFCs/mL inoculados inicialmente en cada matriz, que es la cantidad teórica añadida en cada *spiking*, basada en las curvas patrón de cada microorganismo.

<b>B. cereus</b>							
Matriz	Réplica	Colonias (dilución -1)	Media	SD	Media matriz	SD	Nº UFCs
Lácteo	1	250 260	255	7,07	243	39,47	2,43E+04
	2	160 280	220	84,85			
	3	240 250	245	7,07			
	4	310 290	300	14,14			
	5	200 190	195	7,07			
Pastelería	1	218 246	232	19,80	261,5	21,47	2,62E+04
	2	249 268	258,5	13,44			
	3	180	255	106,07			

		330					
	4	290 254	272	25,46			
	5	270 310	290	28,28			
	1	150 250	200	70,71	175	22,36	1,75E+04
Cárnico	2	170 190	180	14,14			
	3	210 170	190	28,28			
	4	120 200	160	56,57			
	5	120 170	145	35,36			
Pescado	1	210 220	215	7,07	226,8	25,62	2,27E+04
	2	250 210	230	28,28			
	3	250 280	265	21,21			
	4	260 198	229	43,84			
	5	180 210	195	21,21			
Comida procesada	1	120 200	160	56,57	204,8	33,68	2,05E+04
	2	210 195	202,5	10,61			
	3	310 200	255	77,78			
	4	136 270	203	94,75			
	5	190 217	203,5	19,09			

Tabla 7. Recuento UFCs mediante el método de dilución en placa de *B. cereus*.

En el estudio realizado sobre *S. aureus*, como se observa en la *Tabla 8*, muestra en el recuento en placa en todos los casos una cantidad inoculada teórica de  $3 \times 10^4$  UFCs/mL, siendo estos valores de  $6,46 \times 10^4$ ,  $7,42 \times 10^4$ ,  $8,67 \times 10^4$ ,  $1,70 \times 10^5$  y  $7,19 \times 10^4$ , en las matrices de lácteo, pastelería, cárnico, pescado y comida procesada respectivamente.

<i>S.aureus</i>							
Matriz	Réplica	Colonias (dilución -1)	Media	SD	Media matriz	SD	Nº UFCs
Lácteo	1	810 580	695	162,63	646	121,57	6,46E+04
	2	730 660	695	49,50			
	3	520 990	755	332,34			
	4	350	440	127,28			

		530					
	5	330 960	645	445,48			
Pastelería	1	590 430	510	113,14	742	156,79	7,42E+04
	2	780 920	850	98,99			
	3	810 740	775	49,50			
	4	620 720	670	70,71			
	5	920 890	905	21,21			
Cárnico	1	740 1020	880	197,99	1700	668,96	8,67E+04
	2	740 950	845	148,49			
	3	940 650	795	205,06			
	4	790 910	850	84,85			
	5	810 1120	965	219,20			
Pescado	1	1600 640	1120	678,82	1700	668,96	1,70E+05
	2	740 990	865	176,78			
	3	1940 2800	2370	608,11			
	4	1650 2740	2195	770,75			
	5	2370 1530	1950	593,97			
Comida procesada	1	450 680	565	162,63	719	223,09	7,19E+04
	2	1350 840	1095	360,62			
	3	680 400	540	197,99			
	4	660 780	720	84,85			
	5	460 890	675	304,06			

Tabla 8. Recuento UFCs mediante el método de dilución en placa de *S. aureus*.

En el recuento en placa de las diversas contaminaciones artificiales con *E. coli*, como se observa en la *Tabla 9*, de nuevo es muy similar a la cantidad inoculada de  $3 \times 10^4$  UFCs/mL. En lácteo es de  $3,33 \times 10^4$  UFCs/mL, en pastelería, cárnico y comida procesada es de  $4,00 \times 10^4$ ,  $4,21 \times 10^4$  y  $5,78 \times 10^4$  UFCs/mL respectivamente.

<i>E. coli</i>							
Matriz	Réplica	Colonias (dilución -1)	Media	SD	Media matriz	SD	Nº UFCs
Lácteo	1	410	400	14,14			

		390			333	40,71	3,33E+04
	2	390 290	340	70,71			
	3	280 310	295	21,21			
	4	250 380	315	91,92			
	5	370 260	315	77,78			
Pastelería	1	390 430	410	28,28	400	30,62	4,00E+04
	2	380 320	350	42,43			
	3	460 400	430	42,43			
	4	450 380	415	49,50			
	5	420 370	395	35,36			
Cárnico	1	450 400	425	35,36	421	100,46	4,21E+04
	2	330 390	360	42,43			
	3	490 300	395	134,35			
	4	660 520	590	98,99			
	5	410 260	335	106,07			
Pescado	1	480 480	480	0,00	608,75	379,88	6,09E+04
	2	1010 1340	1175	233,35			
	3	310 470	390	113,14			
	4	300 480	390	127,28			
	5	E E					
Comida procesada	1	530 420	475	77,78	578	122,45	5,78E+04
	2	780 720	750	42,43			
	3	420 570	495	106,07			
	4	490 520	505	21,21			
	5	670 660	665	7,07			

Tabla 9. Recuento UFCs mediante el método de dilución en placa de *E. coli*.

## 2. Ensayos de inactivación de ADNg procedente de células muertas mediante el agente intercalante EMA.

Como se ha explicado anteriormente, el EMA penetra sólo en las células muertas, y allí se une covalentemente al ADN inhibiendo su posible amplificación posterior por PCR. Por tanto, mediante la qRTi-PCR sólo amplifica el ADN procedente de las células viables, permitiendo la cuantificación de las

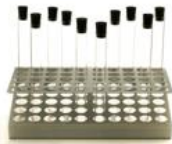
mismas. Fue necesario desarrollar protocolos estandarizados de este método, y para ello se desarrollaron 3 protocolos:



### **Primer protocolo:**

Se coloca una lámpara de 500 W a una distancia de 40 cm de las muestras en los tubos de ensayo de 10 mL transparentes, con los tubos colocados en una gradilla.

Se realizan 5 ciclos, en cada uno de los cuales se activa la lámpara durante 2 min, una vez finalizados se apaga y se dejan los tubos en el hielo otros 2 min (*Imagen 1*).



*Imagen 1. Esquema del primer protocolo*



### **Segundo protocolo:**

Se coloca la lámpara de 500 W a 40 cm de los tubos de ensayo con los tubos introducidos en el hielo.

Se realizan de nuevo 5 ciclos, en cada uno de los cuales se activa la lámpara durante 2 min, tras ello, se apaga la lámpara y se dejan durante 2 min los tubos en hielo (*Imagen 2*).



*Imagen 2. Esquema del segundo protocolo.*



### **Tercer protocolo:**

Se coloca la lámpara de 500 W en este caso a 25 cm de distancia y el procedimiento es el mismo que en el segundo protocolo.

Se seleccionó este protocolo debido a que el hielo evita aquí que se sobrecaliente la muestra y mueran las bacterias en exceso, y además la distancia es la adecuada para la activación del EMA (*Imagen 3*).



*Imagen 3. Esquema del tercer protocolo.*

### 3. Ensayo de contaminación artificial de 5 matrices alimentarias y cuantificación de la carga microbiana mediante la técnica de qRTi-PCR.

En primer lugar, se prepararon cultivos estándar de cada microorganismo, midiendo la absorbancia a 600 nm, calculándose así el número de UFCs presentes mediante las ecuaciones de las curvas de crecimiento previamente elaboradas.

Tras la extraer el ADN genómico, se calculó el número de GEs/ $\mu$ L presente en cada muestra, para generar con este dato varias diluciones de valor GE conocido y usarlas para elaborar así la recta patrón en la placa de qRTi-PCR (ver sección de material y métodos).

Para cuantificar el número de copias de cada diana genética presente en las muestras problema a amplificar en cada caso, se usaron esas rectas patrón de cuantificación incluidas en cada grupo de reacciones. (Tabla 10).

Microorganismo	Genoma (pb)	Masa de 1 genoma	Nanodrop (ng/ $\mu$ L)	Nº genomas equivalentes en las soluciones de ADNg desde cultivo estándar
<i>B. cereus</i>	5.339.040	$\frac{5.339.040}{0,978 \times 10^9} = 0,00533904 \text{ pg}$	118	$\frac{118000 \text{ pg} \times 1G}{0,00533904 \text{ pg}} = 2,2 \times 10^7$
<i>E. coli</i>	5.572.590	$\frac{5.572.590}{0,978 \times 10^9} = 0,00557259 \text{ pg}$	122,4	$\frac{122400 \text{ pg} \times 1G}{0,00557259 \text{ pg}} = 2,2 \times 10^7$
<i>S. aureus</i>	2.898.306	$\frac{2.898.306}{0,978 \times 10^9} = 0,0029635 \text{ pg}$	87,7	$\frac{87700 \text{ pg} \times 1G}{0,0029635 \text{ pg}} = 2,9 \times 10^7$

Tabla 100. Cuantificación del número de genomas presentes en cada muestra tras su cuantificación en Nanodrop para realizar la recta patrón de la qRTi-PCR.

Tras ello, se realizaron diluciones seriadas en base 10, desde  $10^6$  GEs hasta 100 GEs, para realizar la recta patrón necesaria para la qRTi-PCR.

Una vez extraído, mediante el kit descrito, el ADN de cada muestra problema desde los *spikings* realizados, se llevó a cabo la reacción qRTi-PCR.

El análisis de la recta patrón obtenida en cada placa de qRTi-PCR permitió considerar solamente aquellas rectas con un valor de  $R^2 \geq 0,98$ .

Con ayuda de la recta patrón de calibración, y del software 7900 HT Sequence Detection Systems (SDS) versión 2.3 de Applied Biosystems, se extrapolaron los valores obtenidos de cada muestra problema para calcular sus GEs. Todos estos experimentos se realizaron por duplicado para cada muestra problema de ADN.



En el caso de los resultados obtenidos al cuantificar las contaminaciones artificiales realizadas con *B. cereus*, como se observa en la *Tabla 11*, no se supera en ninguna de las matrices la cantidad inoculada de  $3 \times 10^4$  UFCs/mL. El valor obtenido en el caso de la matriz perteneciente a pastelería es, donde más se aproxima, con  $1,39 \times 10^4$  UFCs/mL. En el resto de matrices, se obtienen resultados menores en un orden de magnitud:  $4,24 \times 10^3$ ,  $4,25 \times 10^3$ ,  $6,26 \times 10^3$  y  $5,22 \times 10^3$  en las matrices de lácteo, cárnico, pescado y comida procesada respectivamente.

<b>B. cereus</b>					
<b>Matriz</b>	<b>Réplica</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Media matriz</b>	<b>SD</b>
Lácteo	6,46E+03	5,93E+03	756,60	4,24E+03	1364,99
	5,39E+03				
	2,80E+03	2,81E+03	14,14		
	2,82E+03				
	5,21E+03	5,28E+03	98,99		
	5,35E+03				
3,39E+03	4,14E+03	1053,59			
4,88E+03					
3,37E+03	3,03E+03	487,90			
2,68E+03					
Pastelería	3,39E+03	3,20E+03	268,70	1,39E+04	18588,51
	3,01E+03				
	3,68E+03	3,78E+03	141,42		
	3,88E+03				
	4,05E+03	4,46E+03	572,76		
	4,86E+03				
5,01E+03	1,13E+04	8902,47			
1,76E+04					
5,66E+04	4,66E+04	14142,14			
3,66E+04					
Cárnico	2,07E+03	1,74E+03	466,69	4,25E+03	2158,86
	1,41E+03				
	2,23E+03	2,39E+03	219,20		
	2,54E+03				
	4,95E+03	4,62E+03	466,69		
	4,29E+03				
5,35E+03	5,62E+03	374,77			
5,88E+03					
6,87E+03	6,87E+03	0,00			
6,87E+03					
Pescado	7,84E+03	1,37E+04	8315,58	6,26E+03	4386,64
	1,96E+04				
	1,13E+03	2,35E+03	1718,27		
	3,56E+03				
	4,50E+03	4,50E+03	0,00		
	4,50E+03				
4,97E+03	4,56E+03	579,83			
4,15E+03					
5,97E+03	6,20E+03	318,20			
6,42E+03					

Comida procesada	5,48E+03	5,27E+03	304,06	1510,76
	5,05E+03			
	2,54E+03	2,86E+03	445,48	
	3,17E+03			
	6,21E+03	5,11E+03	1555,63	
	4,01E+03			
	7,62E+03	6,98E+03	912,17	
	6,33E+03			
3,72E+03	5,89E+03	3061,77		
8,05E+03				

Tabla 111. Resultado de las UFCs mediante qRTi-PCR de *B. cereus*

En cuanto al resultado con las matrices inoculadas con *S. aureus*, como se ve en la Tabla 12, se obtienen valores con exponente  $10^4$  UFCs/mL en las matrices de lácteo, pescado y comida procesada, reduciéndose el exponente a  $10^3$  en el caso de las matrices correspondientes al cárnico y a pastelería, con  $2,78 \times 10^3$  y  $2,17 \times 10^3$  respectivamente.

<i>S. aureus</i>					
Matriz	Réplica	Media	SD	Media matriz	SD
Lácteo	2,23E+04	2,44E+04	2899,14	1,83E+04	14741,41
	2,64E+04				
	2,74E+04	4,03E+04	18172,64		
	5,31E+04				
	1,92E+04	1,65E+04	3818,38		
	1,38E+04				
9,25E+03	5,26E+03	5642,71			
1,27E+03					
1,08E+03	4,98E+03	5508,36			
8,87E+03					
Pastelería	2,74E+03	2,83E+03	127,28	2,17E+03	2098,37
	2,92E+03				
	5,88E+03	5,56E+03	459,62		
	5,23E+03				
	1,77E+03	1,30E+03	671,75		
	8,20E+02				
4,56E+02	5,49E+02	131,52			
6,42E+02					
6,48E+02	6,45E+02	4,24			
6,42E+02					
Cárnico	4,46E+03	5,03E+03	806,10	2,78E+03	1386,43
	5,60E+03				
	2,94E+03	3,05E+03	148,49		
	3,15E+03				
	2,74E+03	2,26E+03	678,82		
	1,78E+03				
2,13E+03	2,13E+03	0,00			
2,13E+03					
1,41E+03	1,42E+03	7,07			
1,42E+03					
Pescado	1,70E+04	1,73E+04	424,26		
	1,76E+04				
	1,65E+04	1,62E+04	494,97		

	1,58E+04				2575,75
	1,46E+04 1,38E+04	1,42E+04	565,69	1,42E+04	
	1,17E+04 1,33E+04	1,25E+04	1131,37		
	1,23E+04 9,70E+03	1,10E+04	1838,48		
Comida procesada	1,26E+04 1,21E+04	1,24E+04	353,55		3321,46
	1,68E+04 1,58E+04	1,63E+04	707,11		
	9,05E+03 9,29E+03	9,17E+03	169,71	1,11E+04	
	9,23E+03 9,25E+03	9,24E+03	14,14		
	8,09E+03 8,33E+03	8,21E+03	169,71		

Tabla 122. Resultado de las UFCs mediante qRTI-PCR de *S. aureus*.

Finalmente, los resultados para las matrices contaminadas artificialmente con *E. coli*, se reflejan en la *Tabla 13*. Se observa que obtenemos un resultado con exponente de  $10^4$  en el caso de la matriz correspondiente al lácteo, y muy cercano en el caso de la comida procesada ( $9,59 \times 10^3$ ). En el resto de matrices, carne, pescado y pastelería, se obtienen valores de  $3,03 \times 10^3$ ,  $6,01 \times 10^3$  y de  $3,75 \times 10^3$  respectivamente.

<i>E. coli</i>					
Matriz	Réplica	Media	SD	Media matriz	SD
Lácteo	5,15E+03 7,07E+03	6,11E+03	1357,65		14993,66
	4,90E+03 4,23E+03	4,57E+03	473,76		
	7,84E+03 2,54E+04	1,66E+04	12416,80	1,94E+04	
	2,70E+04 3,68E+04	3,19E+04	6929,65		
	3,72E+04 3,84E+04	3,78E+04	848,53		
Pastelería	3,19E+03 1,86E+03	2,53E+03	940,45		1290,04
	3,44E+03 3,70E+03	3,57E+03	183,85		
	3,99E+03 4,41E+03	4,20E+03	296,98	2,60E+03	
	1,46E+03 1,52E+03	1,49E+03	42,43		
	1,23E+03 1,20E+03	1,22E+03	21,21		
Cárnico	2,74E+03 2,84E+03	2,79E+03	70,71		391,92
	2,70E+03 2,46E+03	2,58E+03	169,71		
	2,97E+03 2,82E+03	2,90E+03	106,07	3,03E+03	

	4,54E+03	3,52E+03	1442,50		
	2,50E+03				
	2,84E+03	3,34E+03	707,11		
	3,84E+03				
Pescado	4,41E+03	4,30E+03	155,56	6,01E+03	3757,17
	4,19E+03				
	2,97E+03	2,55E+03	593,97		
	2,13E+03				
	3,56E+03	1,23E+04	12402,65		
	2,11E+04				
5,89E+03	6,13E+03	339,41			
6,37E+03					
4,60E+03	4,74E+03	197,99			
4,88E+03					
Comida procesada	2,19E+04	1,62E+04	8061,02	9,59E+03	4039,16
	1,05E+04				
	5,39E+03	5,42E+03	35,36		
	5,44E+03				
	6,31E+03	7,60E+03	1824,34		
	8,89E+03				
9,68E+03	9,58E+03	141,42			
9,48E+03					
9,21E+03	9,17E+03	56,57			
9,13E+03					

Tabla 133. Resultado de las UFCs mediante qRTi-PCR de *E. coli*.

## Discusión.

Los microorganismos patógenos de origen alimentario presentan gran importancia económica y sanitaria, debido a su capacidad de causar enfermedades con gran incidencia a nivel mundial (Wallace *et al.*, 2000).

Los principales métodos de detección de estos patógenos en la industria alimentaria y el ámbito clínico se basan en el uso de técnicas clásicas de microbiología, como la siembra y el recuento en placa; en métodos bioquímicos e inmunológicos. A pesar de la utilidad de estos métodos a lo largo de los años, se ven limitados en cuanto a exactitud, y en cuanto al tiempo de obtención de resultados. Por ello, los métodos moleculares basados en ADN se presentan como una opción más rápida que los métodos habituales. Esto se traduce en una respuesta más rápida ante brotes de patógenos alimentarios, y una disminución de pérdidas económicas.

De ahí, la necesidad de establecer un protocolo para la detección de los microorganismos patógenos alimentarios viables. Para desarrollar este protocolo, en primer lugar, se decidió inactivar del ADNg procedente de células muertas en las muestras alimentarias, mediante el agente intercalante EMA. Se probaron para esto tres tipos de protocolos de tratamiento de los cultivos celulares.

En el primer protocolo desarrollado, la incidencia de la lámpara de 500 W sobre las muestras daba lugar a una muerte de las bacterias ocasionada por el sobrecalentamiento, por lo que los resultados en la qRTi-PCR siempre eran mucho menores que los que cabía esperar según la cantidad inoculada de bacterias. Por lo tanto, se introdujo la presencia de hielo, para evitar el calentamiento de las muestras, manteniendo la misma distancia entre el foco de luz y las muestras.

Con las correcciones debidas a partir del primer protocolo, se desarrolló el segundo protocolo, en el cual también había un fallo en la distancia entre las muestras y el foco de luz, ya que, al ser 40 cm, la luz no incidía lo suficiente para la activación del EMA y, por tanto, en la qRTi-PCR obteníamos un recuento muy alto en comparación a lo inoculado, por tanto, el recuento no era fidedigno ya que posiblemente se contasen células muertas. Por lo tanto, para evitar el recuento de células muertas, se redujo la distancia entre la lámpara y las muestras a 25 cm.

Este último protocolo, en el cual se mantienen las muestras en el hielo durante todo el proceso de activación del EMA, evitando así el problema de sobrecalentamiento del primer protocolo y, se redujo la distancia entre el foco de luz y las muestras, permitiendo actuar el EMA correctamente.

El motivo del empleo del EMA como herramienta para la diferenciación entre células viables y muertas se debe a que la PCR no es capaz de discriminar el ADN entre bacterias vivas y muertas. El EMA es capaz de atravesar la membrana celular de las células muertas, pero no de las vivas, y luego, a través de la irradiación con la luz visible, se consigue que el EMA genere un radical nitreno, dando lugar a una unión covalente irreversible con el ADN, reduciendo así la señal de PCR del ADN procedente de las bacterias muertas (Minami, J. *et al.*, 2010).

Las principales dificultades en el desarrollo de los protocolos con el EMA están centradas en la concentración elegida, el tiempo de tratamiento en oscuridad y el tiempo de irradiación de luz visible (Minami, J. *et al.*, 2010).

Wu, y colaboradores, desarrollaron un experimento en el cual se inoculaban distintas concentraciones de EMA a las suspensiones celulares, posteriormente se dejaron las muestras 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se introducían en hielo y se exponían a irradiación durante 15 min por medio de una lámpara halógena de 500 W a una distancia de 12 cm para activar el EMA (Ping Wu, G. *et al.*, 2015).

Respecto a las concentraciones del EMA, se ha informado que la amplificación del ADN de las bacterias viables puede ser parcialmente suprimida ante concentraciones elevadas de EMA. Kobayashi *et al.*, realizaron diversos experimentos donde vieron que concentraciones superiores a 50 µg/mL, aceleraban la penetración del EMA en las bacterias muertas, pero también se producía una penetración parcial dentro de las bacterias vivas, pudiendo dar lugar a una infravaloración de las células viables o dar lugar a falsos negativos en la detección de las bacterias patógenas (Minami, J. *et al.*, 2010). También se ha observado por microscopía electrónica que el tratamiento con EMA a concentraciones mayores de 1 µg/mL con la posterior irradiación de luz visible promueve directamente la inactivación del ADNg. En nuestro caso hemos empleado, por muestra, 1,5 µL de EMA a una concentración de 5 mg/mL.

Respecto al segundo objetivo, de comparación de la cuantificación de la carga microbiana en 5 matrices alimentarias contaminadas artificialmente, mediante ensayos de dilución en placa y qRTi-PCR, se obtuvieron los resultados que se muestran en la *Tabla 14*.

Bacteria	Matriz alimentaria	Método clásico	qRTi-PCR
<b><i>B. cereus</i></b>	Lácteo	2,43E + 04	4,24E + 03
	Pastelería	2,62E + 04	1,39E + 04
	Cárnico	1,75E + 04	4,26E + 03
	Pescado	2,27E + 04	6,26E + 03
	Comida procesada	2,05E + 04	5,22E + 03
<b><i>S. aureus</i></b>	Lácteo	6,46E + 04	1,83E + 04
	Pastelería	7,42E + 04	2,17E + 03
	Cárnico	8,67E + 04	2,78E + 03
	Pescado	1,70E + 05	1,42E + 04
	Comida procesada	7,19E + 04	1,11E + 04
<b><i>E. coli</i></b>	Lácteo	3,33E + 04	1,94E + 04
	Pastelería	4,00E + 04	3,75E + 03
	Cárnico	4,21E + 04	3,03E + 03
	Pescado	6,09E + 04	6,01E + 03
	Comida procesada	5,78E + 04	9,59E + 03

*Tabla 14.* Resultados obtenidos mediante la técnica de dilución en placa y qRTi-PCR de las distintas especies bacterianas.

El método convencional de detección está basado en la siembra y cultivo de los patógenos presentes en una matriz alimentaria dada. Este método ha sido empleado durante muchos años, pero presenta ciertas limitaciones como es el alto nivel de trabajo de laboratorio y tiempo necesario para obtener los resultados. Pudiendo llegar hasta 96 h para obtener confirmación, retrasando, por tanto, las acciones adecuadas para detener o contener un brote.

Los métodos moleculares, como la PCR, permiten una detección rápida de patógenos transmitidos por los alimentos, evitando así plazos prologados y el intenso trabajo de laboratorio. Además, permiten obtener resultados en menos tiempo que los métodos de cultivo convencionales, en menos de un día y reducir el tiempo de análisis de los mismos. Todo esto contribuye a abaratar los costes de almacenamiento para la industria alimentaria.

Respecto a los resultados obtenidos en este TFM utilizando el método clásico de contaje en placa, siempre se obtuvieron cifras muy similares a las  $3 \times 10^4$  UFCs/mL inoculadas teóricamente de forma inicial en cada matriz alimentaria.

En cuanto a los resultados obtenidos aquí con la técnica de qRTi-PCR, se obtuvieron en la mayoría de los casos exponentes de  $10^3$  UFCs/mL, dando lugar a una infravaloración de la cantidad inicial inoculada.

A pesar de que los resultados obtenidos mediante la técnica clásica eran más cercanos a los valores esperados de UFCs/mL, el tiempo empleado para obtenerlos superó las 48 h, se requirieron medios de cultivo específicos para cada microorganismo y el tiempo de análisis (recuento de las colonias) fue elevado si se compara con el de la qRTi-PCR.

La diferencia obtenida para estos valores de UFCs/mL en el caso de los experimentos con qRTi-PCR puede deberse a distintas causas. Una de ellas es la alta densidad de las matrices, ya que, en la etapa de obtención del ADNg mediante el kit comercial empleado, se encontraron dificultades a la hora de la extracción a través de columna, y esto puede ocasionar que no se obtenga el ADN genómico en su totalidad y parte del mismo quede retenido en la matriz. Por otro lado, hay que tener en cuenta también los aspectos positivos de esta técnica como son su rapidez de elaboración, obteniendo los resultados en menos de 6 h, la rapidez también en el análisis de los resultados mediante el programa informático 7900 HT Sequence Detection Systems (SDS) versión 2.3 de Applied Biosystems y la reducción de los costes en materiales.

Podemos concluir, que se necesitan sistemas más eficaces para la extracción del ADNg en lo que a métodos moleculares se refiere, en el caso de las matrices alimentarias, ya que se trata de matrices densas que obstaculizan el proceso. Pese a ello, la velocidad de la técnica, supone una gran ventaja respecto a los métodos tradicionales, tanto en lo que a personal se refiere, así como en cuanto a costes económicos.

En cuanto a los métodos clásicos, como la dilución en placa, supusieron durante muchos años la principal técnica empleada, pero hoy en día, en ámbitos como la industria, suponen un gasto en tiempo y en dinero elevado, y en estos casos lo que debe primar es la rapidez, para llevar a cabo las actuaciones pertinentes.



## Conclusiones.

1. Se ha optimizado un método de inactivación del ADNg de las células no viables mediante un protocolo basado en el empleo del agente intercalante EMA. Se ha demostrado experimentalmente que mediante la adición de 1,5  $\mu\text{L}$  de EMA a una concentración de 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , su posterior incubación en oscuridad y su exposición a la luz mediante una lámpara de 500 W a una distancia de 20 cm, permite obtener un número de UFCs muy aproximado, con una de un orden de magnitud, respecto al recuento en placas en medio sólido.
2. Se han comparado dos métodos de detección de tres microorganismos patógenos alimentarios, el recuento por dilución en placa y por qRTi-PCR, a partir de 5 tipos de matrices alimentarias contaminadas artificialmente. Se han encontrado diferencias máximas de un orden de magnitud, respecto al resultado de la dilución en placa, debido posiblemente a la densidad de las matrices. Aun así, es un método con varios beneficios, como son su rapidez, costes y ahorro de trabajo.

## Bibliografía

1. Adams M, Motarjemi Y. Basic Food Safety for Health Workers. World Health Organisation (WHO) Geneva; 1999.
2. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory : genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004; 40:101–11.
3. Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010;2:1751–73.
4. Argudín, M. Epidemiología molecular y bases genéticas de la resistencia y virulencia de *Staphylococcus aureus* de diferente origen. Oviedo, Asturias - España. 2011.
5. Beauchamp, C y Soros J. Diarrheagenic *Escherichia coli*, en: *Pathogens and Toxins in Food.* (Edt). Juneja, V y Sofos, J. ASM press, Washington, USA. 2010; 71-93.
6. Betley, MJ; Borst, DW y Regassa, LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.* 1992.
7. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog.* 2011;2011:1–13.
8. Bustin, S. Y Nolan, T. *Chemistries. A-Z of Quantitative PCR.* International University Line, La Jolla, CA. USA. 2009; 215-278.
9. Ceuppens S, Van De Wiele T, Rajkovic A, Ferrer-cabaceran T, Heyndrickx M, Boon N, et al. Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol.* 2012;155(3):241–6.
10. Claus, D y Berkeley, R.C.V. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams and Wilkins, Baltimore. 1986; 1105-1139.
11. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev.* 2010;8:26–38.
12. Chaudhuri RR, Henderson IR. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):214–26.
13. Deininger S, Stadelmaier A, Aulock S Von, Morath S, Schmidt RR, Hartung T. Definition of Structural Prerequisites for Lipoteichoic Acid-Inducible Cytokine Induction by Synthetic Derivatives. *J Immunol.* 2003;170:4134–8
14. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):16–34.

15. Donnenberg, MS; Giron, JA; Nataro, JP y Kaper, JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 3427-3437.
16. Ehling-Schulz, M.; Guinebretiere, M.H.; Monthán, A.; Berge, O.; Fricker, M. y Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;260:232–40
17. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 1998;6(12):484–8.
18. Foster TJ. Immune Evasion by *Staphylococci*. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:948–58.
19. Fritze D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera : The Aerobic Endospore - Forming Bacteria. *Phytopathology.* 2004;94(11):1245–8.
20. Glynn, B. Rapid Nucleic Acid-Based Diagnostics Methods for the Detection of Bacterial Pathogens. En: Zourob, M; Elwary, S y Turner, A.(Edt). *Principles of Bacterial Detection.* Springer Science + Business Media, LCC. 2008, New York, USA; 603-628.
21. Gorski, L y Csordas, A. Molecular Detection: Principles and Methods. En: Liu, D (Edt.) *Molecular detection of foodborne pathogens.* CRC Press, Boca Raton, FL. 2010; Cap. 10, 1-20.
22. Götz F, Bannerman T, Schleifer K-H. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* [Internet]. *The Prokaryotes.* 3º Ed. New York: Springer Science + Business Media. 2006. 1-75.
23. Granum, PE y Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;157:223–8.
24. Griffiths M.W. *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* spp. In Juneja V, Sofos J (ed), *Pathogens and Toxins in Foods.* ASM Press, Washington, DC; 2010.
25. Hayashi, T; Makino, K; Ohnishi, M; Kurokawa, K; Ishii, K; *et al.* Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. 2001; *ADN Res*8: 11-22
26. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* ADN polymerase. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88: 7276–80.
27. Hoorfar J. *Rapid Detection , Characterization and Foodborne Pathogens.* APMIS, Vol. 119. Technical University of Denmark; 2011.
28. Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. *Escherichia albertii* sp . nov ., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int J Syst*

- Evol Microbiol. 2003;53:807–10.
29. Ingraham, JL y Marr, AG. Effect of temperature, pressure, pH and osmotic stress in growth. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol. 1. Neidhardt, FC, et al. (Eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press. 1996; 1570-1578.
  30. Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2003;423(May):87–91.
  31. Kluytmans JAJW, Wertheim HFL. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Prevention of Nosocomial Infections. *Infection*. 2005;33(1):3–8.
  32. Levin, RE. Rapid detection and characterization of foodborne pathogens. CRC Press. Boca Raton, FL. 2010.
  33. Levine, M. Bacteria Fermenting Lactose and the Significance in Water Analysis. Bull. 62. Iowa State College Engr. Exp. Station. 1921.
  34. Love, TE y Jones, B. Introduction to Pathogenic Bacteria. En: Zourob, M; Elwary, S y Turner A. (Edt). Principles of Bacterial Detection. Springer Science + Business Media, LLC. New York, USA; 2008; 3-12.
  35. Lowy F. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;520–32.
  36. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Veld JH. Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine : Validation and the Effects of Bile. *J Dairy Sci*. 1997; 80(6):1031–7.
  37. Martínez Blanch JF. Desarrollo de métodos rápidos para el control de *Bacillus cereus* en alimentos. Universitat de València. Servei de Publicacions; 2008.
  38. Martínez-blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2009;135(1):15–21.
  39. Maughan H, Van Der Auwera G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genet Evol*. 2011;11(5):789–97.
  40. Minami J, Yoshida K, Soejima T, Yaeshima T, Iwatsuki K. New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical tool. *J Appl Microbiol*. 2010;109:900–9.
  41. Montville, T.; Matthews, K. y Kniel, K. Food Microbiology: an introduction. 3<sup>o</sup> ed. Washington D.C.: ASM press; 2012.
  42. Moroni, P; Pisoni, G.; Cremonesi, P. y Castiglioni, B. Molecular detection of foodborne

- pathogens. *Staphylococcus* en Liu, D. (Edt). CRC Press, Boca Ratón, FL. 2010; Cap. 10, 245-259.
43. Mullis K, Faloona F. Specific Synthesis of ADN in Vitro via a Polymerase- Catalyzed Chain Reaction. *Meth Enzym.* 1987;155:335–50.
  44. Murray, PR; Rosenthal, KS y Pfaller, MA. *Microbiología Médica*. 6º ed., Elsevier, Spain. 2009.
  45. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142–201.
  46. NCBI Genome. Genome of *Staphylococcus aureus*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/154> al 30/06/2017.
  47. Neidhardt, FC. The enteric bacterial cell and the age of bacteria. In: Neidhardt, FC; Curtiss, R; Ingraham, JL, Lin ECC; Low, KB; Magasanik, B; Reznifoff, WS; Riley, M; Schaechter y M; Umbarger, HE (Eds). *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, 2º ed. ASM Press, Washington, DC. 1996, 1-4.
  48. Organización Mundial de la Salud (OMS). Inocuidad de los alimentos. [Internet] [Consultado el 20 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
  49. Ottow JCG, Bodenkunde I, Pflanzenproduktion F. Ecology, Physiology and Genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol.* 1975;29:79–108.
  50. Park, JT. The murein sacculus. En: *Escherichia coli and Salmonella*, Vol. 1. Neidhardt, FC, et al., (Edt). Washington, DC; American Society for Microbiology Press, 1996: 48-57.
  51. Pereira JL, Salzberg SP, Bergdoll MS. Effect of Temperature , pH and Sodium Chloride Concentrations on Production of Staphylococcal Enterotoxins A and B. *J Food Prot.* 1982;45(14):1306–9.
  52. Phillips, J. Real-Time RT-PCR: What Lies Beneath the Surface. En: Bustin, S. *A-Z of Quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, CA, USA. 2009; 47-87.
  53. Piérard D, Greve H De, Haesebrouck F, Mainil J. O157 : H7 and O104 : H4 Vero / Shiga toxin- producing *Escherichia coli* outbreaks : respective role of cattle and humans. *Vet Res.* 2012;43(1):13.
  54. Que, Y Moreillon, P. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal Toxic Shock) en Mandell, GL; Bennett, JE y Dolin, R. *Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases*. 7º Ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA; 2010.
  55. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635–700.

56. Santos CA, Almeida FS, Guimarães AG, Abrahão WM, Arantes OMN, Vilas-Bôas GT. RE-PCR variability and toxigenic profile of food poisoning, foodborne and soil-associated *Bacillus cereus* isolates from Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2011; 151: 277-283.
57. Scanga, JA. Slaughter and fabrication/boning processes and procedures. En Sofos (Edt) *Improving the safety of fresh meat*. CRC press, Boca Ratón, FL. 2005; 259-272.
58. Schraft, H and Griffiths, M. W. 1995. "Specific Oligonucleotide Primers for Detection of Endoglucanase Positive *Bacillus Subtilis* by PCR." *Appl Environ Microbiol* 61(1):98–102. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s13205-013-0177-6>).
59. Scheutz, F y Strockbine, N. *Escherichia*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol II. Bergey's manual trust, Michigan, USA. 2005.
60. Seok, K. y Bohach, G. *Staphylococcal Food Poisoning*, en *Pathogens and Toxins in Food*. Juneja, V y Sofas J. (Edt.). ASM press, Washington, USA. 2010; 119-131.
61. Shipley, G. An introduction to Real-Time PCR. En: Tefvik-Dorak, M. *Real-Time PCR*. Taylor & Francis Group, Oxford, UK. 2006; 1-39.
62. Smith, Nathan R; Gordon, Ruth E. y Clark FE. *Aerobic Sporeforming Bacteria*. U.S. Department of Agriculture. Monograph Nº 16; 1952.
63. Stopforth, J; Balasubrahmanyam, K y Sofos, JN. Interventions for Hazard Control in Foods Preharvest. En: Juneja, V y Sofos, J. (Edt). *Pathogens and Toxins in Food*. ASM press, Washington, USA. 2010, 357-377.
64. Varnam, A.H. y Evans, M.G. *Foodborne pathogens: an illustrated test*. Mosby Year Book. 1991; 267-288.
65. Wallace, DJ; Vam Gilder, T; Shallow, T; Fiorentino, T; Segler, SD; Smith, KE; Shifecaw, B; Etzel, R; Garthright, WE; Angulo, FJ and the Food Net Working Group (2000). Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. *J. Food. Prot.* 63: 807-809.
66. Wenzel RP, Per TM. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence postoperative wound infection. *J Hosp Infect.* 1995;31:13–24.
67. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ, Public C. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol Infect.* 1993;110:519–31.
68. Wu GP, Chen SH, Levin RE. Application of Ethidium Bromide Monoazide for Quantification of Viable and Dead Cells of *Salmonella enterica* by real-time loop-mediated isothermal amplification. *J Microbiol Methods.* 2015.
69. Yousef, A. *Detection of Bacterial Pathogens in Different Matrices: Current Practices*

and Challenges. En: Zourob, M; Elwary, S y Turner, A. (Edt). Principles of Bacterial Detection. Springer Science + Business Media, LLC. 2008, New York, USA; 31-48.