

2.27.608

1053761

STD V /69

STD

TESIS DOCTORAL

91

6

19 ENE. 1998

Eduardo Villalobo



REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA
DETECCIÓN DE SALMONELLA Y SHIGELLA EN MAYONESA

EDUARDO VILLALOBO POLO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ENERO 1998

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

STD V/69

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA
DETECCIÓN DE *SALMONELLA* Y *SHIGELLA* EN MAYONESA.

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Biología por el Licenciado
Eduardo Villalobo Polo.



Director de la Tesis

Sevilla, Enero de 1998

Dr. Antonio I. Torres Rueda
Catedrático de Microbiología

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Apuntes históricos de la microbiología alimentaria.....	1
1. 2. Microorganismos en los alimentos.	
1.2.1. Bacterias.....	1
1.2.2. Hongos.....	2
1.3. Calidad de los alimentos.....	4
1.4. La mayonesa.....	
1.5. Bacterias de los géneros <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .	
1.5.1. <i>Salmonella</i>	8
1.5.2. <i>Shigella</i>	9
1.6. Métodos de detección de microorganismos en alimentos.	
1.6.1. Métodos convencionales.....	11
1.6.2. Métodos no convencionales.....	13
1.7. Objetivos de la Tesis.....	17

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento.....	18
2.2. Aislamiento de microorganismos de muestras de mayonesa.....	20
2.3. Ensayos serológico y bioquímicos.....	21
2.4. Determinación del tiempo de generación.....	22
2.5. Determinación de la concentración de células.....	22
2.6. Preparación de las muestras de células.....	23
2.7. Aislamiento del ADN genómico de bacterias.....	23
2.8. Aislamiento del ADN genómico de levaduras.....	24
2.9. Aislamiento del ADN plasmídico.....	25
2.10. Purificación del ADN de geles de agarosa.....	26
2.11. Purificación de ADN en microcolumna.....	26
2.12. Electroforesis del ADN.....	27
2.13. Cuantificación del ADN.....	28
2.14. Amplificación del ADN por PCR.....	28
2.15. Clonación del ADN.	

2.15.1. Ligación del ADN.....	30
2.15.2. Preparación de células competentes.....	30
2.15.3. Transformación de las células competentes.....	31
2.16. Secuenciación de ADN.....	31
2.17. Transferencia del ADN a membrana.....	33
2.18. Marcaje del ADN.....	34
2.19. Hibridación ADN/ADN.....	34
2.20. Detección del ADN unido a membrana.....	34
2.21. Detección del ADN en pocillo.....	35
2.22. Diseño de los cebadores y las sondas.....	36
3. RESULTADOS	
3.1. Diseño de los cebadores y las sondas.....	37
3.2. Microflora inicial de la mayonesa.....	38
3.3. Especificidad de la PCR con los cebadores que amplifican IS200 o <i>virA</i>	42
3.4. Nivel de detección de la PCR con los cebadores que amplifican IS200 y <i>virA</i>	56
3.5. Amplificación de IS200 y <i>virA</i> en presencia de ADN no homólogo..	62
3.6. Amplificación múltiple de IS200/ <i>virA</i>	66
3.7. Detección por PCR de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en mayonesa.....	69
3.8. Modelo para la detección por PCR de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en mayonesa.....	71
4. DISCUSIÓN.....	73
5. CONCLUSIONES.....	82
6. ABREVIATURAS.....	83
7. BIBLIOGRAFÍA.....	84

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla (dirigido por el Catedrático Antonio Torres Rueda) en colaboración con el Departamento de Control de calidad de Hijos de Ybarra S.A. (dirigido por D. Enrique Trujillo Reina). A ambos quiero agradecer la acogida en sus Departamentos. Además, este trabajo ha sido subvencionado con una beca predoctoral del Plan de Formación del Personal Investigador para el intercambio entre Organismos Públicos y Privados, del Ministerio de Educación y Ciencia.

Al Dr. Antonio Torres, director de esta Tesis, agradezco su constante interés, dedicación y apoyo durante la realización de este trabajo, y por supuesto su amistad.

Este trabajo, desde el año 1994, no se hubiese realizado sin la colaboración de muchas personas, por eso espero que no se quede nadie en el olvido.

Quiero empezar cronológicamente y por eso estoy agradecido a mi tío, Antonio Villalobo, por la oportunidad de iniciarme en la ciencia, en el año 1991 cuando aún era estudiante. Ya en el año 1992 llegué al Departamento y tengo que agradecer a Antonio y a Puri que me brindaran la oportunidad de trabajar con ellos. A partir de ahí, a toda la gente que está o estuvo.

A la gente de mi laboratorio le tengo que agradecer todo. Por orden de antigüedad, Chari, Pili, Nezha, Corín, M^a Jesús, Mercedes, Rocío, Mamen. Aunque no sepa dónde ubicarlo, también a Paco. A Inés por su ayuda en todas las "gestiones". Gracias sobre todo a Corín y Pili porque hemos formado una familia y eso es difícil de conseguir.

A las gentes de otros laboratorios, en especial a la gente del L6. A Ollero porque con él comencé a conocer al ADN, a Charo y Ramón porque son unos magníficos amigos y compañeros. A Baena y Nuri porque aunque pertenezcan a la cocina son del L6. También en especial a la gente del L4, empezando por la cabeza visible, José Enrique, al que le tengo un gran aprecio. Aunque no sea el más viejo, a José María, persona de gran corazón. También mis agradecimientos a Teresa, Ana, Ahmed y Cacao (reciente adquisición). También a las gentes del L3 y L2, sobre todo a los más jóvenes, Ludwig, Hassane, Carlitos y África.

En Ybarra, tengo que agradecer la colaboración de E. Trujillo y J.L. Algeciras. También tengo que agradecer su inestimable ayuda a gentes de otros Departamentos, como a Fernandito, en Córdoba y José Carlos, en Medicina, así como a todos aquellos que me enviaron sus estirpes.

Ya por último, porque si no me dan las uvas, a mis "mujeres" y amigos. A mi madre, lógicamente por parirme y soportarme estoicamente durante 28 años, y a Ana, quién tuvo que convivir conmigo (tarea difícil). Como no, al "harem", Corín Pili y Nezha. A mis amigos Javi y Carmen, quienes también han estado pendientes de mi y por supuesto a los colegas de copas (Alfonso, Alberto y Antonio) que han soportado "al Nani" en días no laborables y sin cobrar.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Apuntes históricos de la microbiología alimentaria.

En el siglo XIX es cuando se producen los avances en microbiología alimentaria, es decir, de aquella parte de la microbiología cuyo objeto de estudio son los microorganismos de los alimentos. Posiblemente, Pasteur sea el gran impulsor de esa especialidad de la microbiología, porque gracias a sus estudios sobre fermentación y putrefacción de alimentos se estableció que los alimentos contenían microorganismos (Jay, 1978 y Ray, 1996).

No obstante y sin saber que existían, el hombre ha sabido desde antiguo que algo modifica las propiedades de los alimentos, aunque es difícil precisar cuando el hombre empieza a ser consciente de este hecho. Se cree que 8000 años a.C., aproximadamente cuando se desarrolla la agricultura y la ganadería, nuestros antecesores sabían que los alimentos tenían que conservarse en frío para que no se pudrieran (Jay, 1978; Ray, 1996). Por tanto, la conservación es uno de los aspectos de la microbiología alimentaria más antiguo que ha perdurado a través del tiempo. El hombre no sólo ha evitado la actividad perniciosa de los microbios sino que se ha aprovechado de ellos para variar las propiedades de los alimentos. Esto lo ha hecho también desde antiguo como por ejemplo la fabricación de la cerveza, conocida ya por los antiguos egipcios (Jay, 1978). Otro aspecto, no menos importante, que se conoce desde antiguo es la transmisión de enfermedades a través de los alimentos. Por eso en la Edad Media se prohibía el consumo de carnes de animales enfermos (Van Logtestijn, 1987). Sin quitar importancia a estos hechos, es necesario decir que el auge e importancia de la microbiología de los alimentos se ha conseguido en este siglo, y que el punto de partida es la trama conceptual que encontramos en la revisión de Mossel e Ingram de 1955.

1.2. Microorganismos en los alimentos.

Todos los alimentos, si exceptuamos algunos que son completamente estériles, contienen uno o más de un tipo de microorganismo. La importancia de esos microbios se debe a que:

- (i) están implicados en la producción de los alimentos o de sus ingredientes.
- (ii) producen deterioro de los alimentos.
- (iii) transmiten enfermedades.

Las fuentes de contaminación de los alimentos son diversas y pueden clasificarse en internas o externas (Frazier y Westhoff, 1988). Son fuentes de contaminación interna las materias primas de las cuales se obtienen los alimentos, es decir, las plantas y los animales. Suelen ser sus superficies externas las responsables de la contaminación, puesto que sus tejidos internos son estériles, al menos en los individuos sanos. Son fuente de contaminación externa los utensilios, equipamiento y personas que están implicados en el proceso de elaboración del alimento. Bien sean de origen interno o externo, todos esos microorganismos se encuentran en el ambiente: el aire, el agua o el suelo.

Las características físico-químicas de los alimentos determinan los microorganismos asociados a ellos y cuáles van a proliferar. De entre todas esas características (Ray, 1996) las más importantes son: los nutrientes, los inhibidores del crecimiento, la temperatura, el pH, la actividad del agua, el potencial redox y la concentración de oxígeno.

Por su importancia y número se examinarán los géneros de bacterias y hongos que más frecuentemente se asocian a los alimentos.

1.2.1. Bacterias.

La novena edición del manual del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, *et al.*, 1994) incluye 560 géneros, de los cuales 48 son los que interesan y se encuentran listados en la Tabla 1.

1.2.2. Hongos.

Constituyen un grupo muy heterogéneo cuya clasificación es, a veces, difícil. Para simplificar se hablará de mohos y levaduras. La Tabla 2 muestra los géneros de mohos y levaduras que se encuentran con más frecuencia asociados a los alimentos.

Tabla 2. Géneros de hongos importantes en alimentos.

CLASE	GÉNERO
Mohos	
Phycomycetes	<i>Mucor</i> <i>Phytophthora</i> <i>Thamnidium</i>
Ascomycetes	<i>Byssochlamys</i> <i>Claviceps</i> <i>Neurospora</i> <i>Sclerotinia</i>
Fungi imperfecti	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Botrytis</i> <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i> <i>Geotrichum</i> <i>Penicillium</i> <i>Sporendonema</i> <i>Sporotrichum</i>
Levaduras	
Ascomycetes	<i>Debaryomyces</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i>
Fungi imperfecti	<i>Candida</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Torulopsis</i>

Tomado de: Hayes, pág. 15, 1985).

1.3. Calidad de los alimentos.

La calidad de un alimento se define por sus propiedades físicas, químicas, organolépticas, los agentes bióticos y abióticos que contenga y su valor nutritivo (Moreno García y García López, 1986). Las administraciones, con sus normas, establecen los límites de calidad de los alimentos, es decir, establecen si son o no aptos para el consumo. Por su ámbito de aplicación hay normas que son internacionales y otras nacionales; algunas industrias tienen

también normas internas, tendentes a elevar el nivel mínimo exigido de calidad del alimento (Chacon, *et al.*, 1986).

Las normas o especificaciones que interesan en este trabajo son las microbiológicas, dirigidas a determinar, en esencia, el número total de microorganismos viables, número de indicadores de contaminación fecal, presencia de patógenos e incluso de sus toxinas (Jay, 1978). Los patógenos que se buscan dependen de cada alimento, pero se acomodan en una de las siguientes categorías:

- (i) tóxicos, si producen venenos o toxinas.
- (ii) infecciosos, si invaden y/o se multiplican en los tejidos.
- (iii) toxiinfecciosos, si son a la vez tóxicos e infecciosos.

También se suele determinar el número de microorganismos que producen alteraciones de los productos, aunque esta modalidad suele ser un control de calidad interno de las industrias alimentarias.

A pesar de que el interés por el control microbiológico de los alimentos es antiguo, en España la norma alimentaria es reciente, de 1983 (Chacon, *et al.*, 1986). Uno de sus principales problemas, al igual que la de otros países, es la ambigüedad en la que define sus términos (ICMSF, 1988). Esta ambigüedad hace que ciertos criterios puedan tener diferente interpretación, quedando a juicio de la persona que realiza el control de calidad. Esta disparidad no sólo se manifiesta por la ambigüedad sino también por la disparidad de criterios cuando comparamos unas normas nacionales con otras. Para definir y unir criterios, al menos en los alimentos comercializados internacionalmente, se constituyó en 1962 la ICMSF (Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos). Desde entonces, este organismo se encarga de reunir, correlacionar y evaluar los hallazgos sobre calidad microbiológica, establecer los criterios más adecuados para cada alimento y sugerir los métodos más adecuados para el muestreo y el análisis (Silliker, *et al.*, vol. 1, 1980).

La garantía higiénica de los alimentos se consigue con medidas a varios niveles (Franciso Polledo, 1986). La primera, llevada a cabo por las industrias, es el control de calidad microbiológico del alimento recién elaborado. La

segunda, llevada a cabo por las administraciones, se consigue realizando inspecciones periódicas en las industrias, analizando los productos comercializados y promoviendo la educación en higiene de alimentos. Pero estas medidas, que continúan aplicándose en la mayoría de los países, son insuficientes. Quizás la mejor medida de garantía es la prevención. Para ponerla en práctica se ideó en 1971 el sistema de análisis de peligros e identificación de puntos críticos (HACCP). El sistema HACCP (ICMSF, 1988) ha sufrido desde su creación varias modificaciones y actualmente sus principios generales son:

- (i) determinar los peligros en todas las etapas de elaboración de los alimentos, desde el crecimiento de los productos crudos hasta el producto final listo para el consumo.
- (ii) identificar los puntos críticos donde se encuentran los peligros.
- (iii) poner en funcionamiento las condiciones necesarias para controlar los peligros en cada punto crítico.
- (iv) poner en funcionamiento medidas correctoras para las posibles desviaciones que ocurran en cada punto crítico.
- (v) establecer sistemas efectivos de registro de todas las actividades.
- (vi) realizar comprobaciones del buen funcionamiento de todas las actividades.

1.4. La mayonesa.

La mayonesa es una emulsión alimenticia en la que la grasa constituye la fase discontinua y el agua la fase continua y cuyos ingredientes son aceite, huevo, vinagre y zumo de limón (Smittle, 1977). Opcionalmente se pueden añadir otros ingredientes como sal, edulcorantes, hortalizas, colorantes y conservantes. Su acidez debe ser como mínimo del 0,2% en ácido acético, su pH inferior a 4,2 y el contenido mínimo en yema de huevo ha de ser del 5%. El producto, convenientemente envasado, ha de ser homogéneo en cuanto a la consistencia y al color. Su sabor es característico dependiendo de sus ingredientes.

Las normas microbiológicas que ha de cumplir son (BOE, 1984):
Recuento de colonias aerobias mesófilas (31°C): máximo 10⁴ colonias/g.
Enterobacterias totales: máximo 10 colonias/g.
Salmonella y *Shigella*: ausencia en 25 g.

La microflora inicial de las mayonesas depende en gran medida de sus ingredientes, en especial del huevo. De cualquier manera son pocos los microorganismos que son capaces de crecer al pH de la mayonesa. Pero realmente no es el pH el responsable final de la ausencia de muchos microorganismos sino que es el ácido acético del vinagre (Silliker, *et al.*, vol. 2, 1980). En el rango de pH de la mayonesa, el ácido acético se encuentra totalmente disociado, ejerciendo su actividad antimicrobiana. Además, la actividad del agua de las mayonesas es baja, debido principalmente a la sal y el azúcar.

Los microorganismos más frecuentemente encontrados (Silliker, *et al.*, vol. 2, 1980) son levaduras, del género *Saccharomyces*, y bacterias gram positivas, de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*. La presencia de *Saccharomyces* o *Lactobacillus* en el producto final no indica en ningún caso que las materias primas empleadas contuvieran una gran cantidad de ellos, más bien hay que entenderlo como una selección natural. La presencia de *Bacillus* es consecuencia, normalmente, de su presencia en muchas especies y de su capacidad de formas esporas de gran resistencia. Estos tres tipos de microorganismos, aunque en el producto final suelen morir, son los responsables del deterioro de este alimento, aunque al final suelen morir. Así, la alteración producida se suele detectar por la presencia de gas y a veces de malos olores y sabores.

La presencia de microorganismos patógenos en las mayonesas ha sido ampliamente estudiada. Los patógenos asociados suelen ser *Salmonella* y *Staphylococcus*, aunque ninguno es capaz de crecer en las mayonesas. Por tanto su presencia hay que buscarla en una defectuosa preparación y control del producto o en una manipulación incorrecta después de su fabricación.

1.5. Bacterias de los géneros *Salmonella* y *Shigella*.

El interés de estas bacterias es múltiple, por una parte porque la legislación sobre mayonesa habla de que su presencia ha de ser controlada y segundo porque son responsables de graves problemas de salud pública a nivel mundial.

1.5.1. *Salmonella* (D'Aoust, 1989).

Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, encuadrada en el grupo 5 (bacilos gram negativos, anaerobios facultativos) de la novena edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, *et al.*, 1994). Algunas de sus características se presentan en la Tabla 3. Existe mucha controversia a la hora de clasificarlas y quizás lo más acertado sea hacerlo en serogrupos, de los que se reconocen hasta más de 2000. Se encuentran en el ambiente, en los alimentos, en los animales de sangre fría y en los de sangre caliente (incluido el hombre). Son patógenos para el hombre, causando enfermedades (salmonelosis) tales como la fiebre tifoidea o la gastroenteritis. La dosis infectiva es variable y depende de la serovariedad (10^1 - 10^5 células). Algunas son productoras de toxinas, enterotoxinas o citotoxinas.

El modo de transmisión de las salmonelas es de persona a persona, por animales o por el ambiente; menos frecuente es la transmisión desde las personas al ambiente. Los síntomas dependen de si se trata de una infección tifoidea o no. Los síntomas de las no tifoideas son diarreas no sangrantes, dolores abdominales, miálgias, fiebre, náuseas o vómitos. Estos síntomas se agudizan en personas aquejadas de otras enfermedades, tales como el SIDA. La fiebre tifoidea es un tipo mucho más grave de salmonelosis, que se caracteriza por malestar, anorexia, dolor de cabeza, incremento gradual de la temperatura y septicemia, la cual es evidente en las muestras de sangre y orina.

El acinamiento, las catástrofes, el hambre, el agua y los alimentos son causas de las epidemias por salmonelas. De hecho es el microorganismo responsable del mayor número de enfermedades relacionadas con la alimentación en el mundo. En concreto, *S. typhimurium* es el agente etiológico más frecuente, aunque también son importantes *S. enteritidis*, *S. infantis* y *S. heidelberg*. No obstante, hay serovariedades que causan epidemia en ciertos países y no en otros.

Las infecciones no tifoideas se producen en el intestino delgado, donde las bacterias entran en las células epiteliales para liberarse después a la lámina propia. Por tanto, las salmonelas no crecen ni se multiplican dentro de las células epiteliales sino que lo hacen en la lámina propia. Allí producen una respuesta inflamatoria, posiblemente debido a la excreción de una toxina. Las infecciones tifoideas se producen también en el intestino delgado, aunque en este caso hay invasión de las células de la mucosa. Esa invasión es seguida por la diseminación a tejidos como el hígado y el bazo. Después, hay una invasión de los riñones, la vesícula y una reinvasión de la mucosa intestinal.

Los loci implicados en las funciones de virulencia están localizados en el nucleoide aunque en muchas serovariedades, por ejemplo *S. typhimurium* o *S. dublin*, algunos de esos loci están localizados también en plásmidos de virulencia.

1.5.2. *Shigella* (Wachsmuth, *et al.*, 1989).

Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, encuadrada en el grupo 5 (bacilos gram negativos y anaerobios facultativos) de la novena edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, *et al.*, 1994). Algunas de sus características se presentan en la Tabla 3. Dentro del grupo se reconocen 4 especies diferentes, las cuales constituyen serogrupos distintos. Son difíciles de diferenciar de algunas estirpes no móviles de *Escherichia coli*, en concreto de aquellas que son enteroinvasivas (EIEC). Se trata de patógenos intestinales humanos y de otros primates y productores de enterotoxinas, cuya dosis infectiva es baja, entre 10 y 100 células. Rara vez se encuentran en alimentos

o en las aguas ya que su vida media en estos ambientes es baja. La enfermedad que producen se denomina shigelosis o disentería bacilar.

El modo de transmisión de las shigelas es de persona a persona. En los casos de transmisión a través de los alimentos o del agua es porque han sido contaminados con heces humanas, posiblemente por ser manipulados por personas portadoras sin síntomas o con síntomas leves. Los síntomas de la enfermedad varían desde infecciones asintomáticas, diarreas leves y sin fiebre hasta disenterías fulminantes. Estas últimas se caracterizan por sangre y mucus en las heces, deshidratación, escalofríos e incluso convulsiones.

El acinamiento, las catástrofes, el hambre y la contaminación fecal de aguas y alimentos son causas de epidemias por shigelas. Hasta la mitad de este siglo fue *S. dysenteriae* la responsable de la mayor parte de esas epidemias pero poco a poco ha sido reemplazada por *S. flexneri* y más recientemente por *S. sonnei*.

La infección por shigelas se produce en la parte final del íleon y en el colon. Allí, las bacterias penetran y se multiplican en el interior del epitelio y comienzan un proceso de invasión de las células epiteliales adyacentes. La invasión es muy limitada pero produce una respuesta inflamatoria fuerte, posiblemente debido a la actividad de la enterotoxina. Al final, las shigelas producen la muerte de las células y la necrosis de gran parte de tejido que acaba ulcerándose. Todas las estirpes virulentas de shigela, y también las EIEC, contienen un plásmido de virulencia en el que se encuentran los loci implicados en las funciones de virulencia aunque algunos de esos genes también se encuentran en el nucleóide.

Tabla 3. Características relevantes de las bacterias de los géneros *Salmonella* y *Shigella* (Holt, et al., 1994)

CARACTERÍSTICA	SALMONELLA	SHIGELLA
Movilidad	flagelos peritricos	inmóviles
Rango de temperatura (°C)	2-45	7-46
Rango de pH	3,7-9,5	4,8-10
Actividad mínima del agua	0,945	0,960
Tolerancia máxima de NaCl (%)	8	6
Actividad oxidasa	negativa	negativa
Actividad catalasa	positiva	positiva
Fermentación de carbohidratos	L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trealosa, D-silosa	D-manitol, D-manosa, maltosa, trealosa
Producción de SH ₂	si	no

1.6. Métodos de detección de microorganismos en alimentos.

Actualmente se dispone de un gran número de métodos para detectar microorganismos, muchos de los cuales se pueden aplicar al campo de la alimentación, aunque por razones obvias sólo nos interesan los que utilizan técnicas microbiológicas. Por conveniencia, se va a distinguir entre el método convencional o tradicional y los métodos no convencionales. Con esta distinción, se intenta subrayar el hecho de que las técnicas de biología molecular, con no mas de dos décadas de antigüedad, han revolucionado el campo de la detección de los microorganismos. A pesar de la importancia que se le da en esta tesis a los métodos de detección hay que tener presente que los métodos de identificación y aislamiento de los microorganismos de los alimentos han evolucionado en paralelo y al mismo ritmo que los métodos de detección.

1.6.1. Métodos convencionales.

Se pueden citar varios, entre ellos la visualización al microscopio, la turbidimetría y el crecimiento o cultivo, que sin duda es el más utilizado. La microscopía y la turbidimetría tienen su aplicación limitada prácticamente al recuento de microorganismos totales. El cultivo tiene una aplicación mas amplia puesto que se usa tanto en el recuento de microorganismos totales, indicadores y patógenos.

Como se mencionó en el apartado Calidad de los alimentos (página 4), el control microbiológico trata de establecer en esencia tres variables, la cantidad de microorganismos totales, los indicadores de contaminación fecal y los patógenos que contaminan un alimento. Para este fin se dispone de diferentes medios de cultivo líquidos y sólidos, alguno de los cuales son selectivos, otros de amplio espectro, otros son electivos y otros indicativos.

Como la mayonesa es el alimento con el que se ha experimentado a lo largo de esta tesis, se explicará de modo sucinto los procedimientos para hacer su control de calidad microbiológico.

Recuento de colonias aeróbicas mesófilas (Messer, *et al.*, 1984). Con ello se pretende determinar el nivel de contaminación del alimento. Lo primero, como en todos los métodos que se explicarán más adelante, es la preparación del homogenado del alimento que se hace diluyendo una cierta cantidad de producto en una solución diluyente y agitando hasta la completa homogenización. Después se prepararán diluciones del homogenado que se establecen en función del nivel de contaminación habitual del producto. De cada una de esas diluciones y por duplicado se inocula una cantidad fija en medio sólido de recuento. Finalmente se incuban las placas inoculadas a 35°C durante 48 h y transcurrido ese tiempo se cuentan las colonias aparecidas.

Enterobacterias totales (Mehlman, *et al.*, 1984). La presencia de *E. coli* en las muestras de aguas es un buen indicador de contaminación fecal, por tanto su presencia puede indicarnos también la de patógenos entéricos. Esto mismo se puede aplicar a las muestras de alimentos aunque en ellos no indica necesariamente la presencia de patógenos. Por tanto una mejor medida de la calidad higiénica se hace determinando el número total de enterobacterias, el cual se realiza fácilmente a partir del recuento de coliformes.

El método de detección de coliformes se basa en la preparación de diluciones de las muestras para inocularlas en medios específicos con los que se observa el crecimiento bacteriano y la producción de gas, seguido de la confirmación y recuento de los presuntos positivos en un medio sólido selectivo. Estos mismos medios pero conteniendo glucosa y un indicador de pH adecuado, sirven para identificar las enterobacterias, ya que estas acidifican el medio (si se añade glucosa y un indicador de pH adecuado se determinan las enterobacterias por la producción de ácido). El primer paso del método dura 24 horas, mientras que la confirmación se realiza en otra 24 horas.

Salmonella (Andrews, *et al.*, 1984). El método trata de aislar e identificar este tipo de bacterias. Este patógeno se detectó primero en muestras clínicas, y los métodos empleados se aplicaron también para su detección en alimentos. Pero como las salmonelas en el alimento compiten débilmente con la microflora y suelen estar metabólicamente modificadas, se tuvieron que

desarrollar métodos específicos para alimentos. Actualmente la metodología en alimentos se basa en tres pasos:

- (i) preenriquecimiento: es un paso inicial en donde las salmonelas dañadas se devuelven a un estado fisiológico estable gracias a un medio líquido nutritivo y no selectivo.
- (ii) enriquecimiento selectivo: se trata de aumentar el número de salmonelas y restringir el de otras bacterias gracias a un medio selectivo que contiene sustancias inhibitorias del crecimiento.
- (iii) selección: con este último paso se pretende, evitando el crecimiento de otros microorganismos, visualizar y aislar las colonias presuntas salmonelas.

Cada una de esas fases requiere la incubación de las muestras al menos durante 24 horas, es decir, el proceso dura tres días. Además, si al final de todo el largo proceso se tienen colonias sospechosas, se procede a su recomprobación.

Shigella (Melhman, 1984). Como en las salmonelas, para detectar las shigelas necesitamos hacer un enriquecimiento de las muestras y un aislamiento selectivo en medio sólido. Sin embargo, los métodos que se emplean actualmente no son efectivos, ya que lo más común es detectar las sigelas por el método de las salmonelas

1.6.2. Métodos no convencionales (Swaminathan y Feng, 1994).

Surgen como respuesta a la necesidad de ganar rapidez, especificidad y capacidad de automatización (Hernández Gimenez, 1986). La mayor parte de estos se han desarrollado para la detección de patógenos, siendo pocos los que determinan la contaminación total de los alimentos. Puesto que los métodos que se enumeran a continuación se basan en las propiedades moleculares de los microorganismos, se ha adoptado el nombre de métodos moleculares para la detección de microorganismos.

Ensayos fisico-químicos. Se basan en la detección de los cambios producidos por los microorganismos debido a su crecimiento, metabolismo o actividad específica de ciertos enzimas. A continuación se describirán las técnicas más empleadas.

La impedancia o conductancia mide los cambios electroquímicos producidos en los medios de crecimiento debido a la actividad metabólica de los microorganismos. Estos métodos se emplean normalmente para el recuento de microorganismos totales, aunque se han desarrollado sistemas para la detección de coliformes y para la detección de *Salmonella*.

La bioluminiscencia mide la producción de luz producida por la enzima luciferasa. Esta enzima es capaz de oxidar el compuesto luciferina en presencia del ion magnesio y del ATP, desprendiéndose fotones en el proceso. Cuando el ATP es el componente limitante de la reacción, la cantidad de fotones producidos es proporcional a la concentración inicial de ATP. Midiendo la cantidad de ATP producido por los microorganismos se obtiene una estima del número que hay en una muestra.

La epifluorescencia indirecta aprovecha la capacidad que tiene el naranja de acridina, que es un fluorocromo, de unirse al ADN de doble cadena. El método consiste en filtrar un homogenado del alimento por un filtro de policarbonato teñido con naranja de acridina. Cuando estos filtros se miran por un microscopio de fluorescencia cada punto de fluorescencia corresponderá a una célula. Tanto este método como la bioluminiscencia se utilizan para el recuento de microorganismos totales, debido a que se basan en propiedades comunes a todos los seres vivos.

Otros métodos miden características físicas de los microorganismos, tales como el perfil de sus ácidos grasos o los cambios en el potencial redox con diferentes carbohidratos. Estos métodos han sido empleados para detectar grupos de microorganismos pero aún siguen evaluándose.

Ensayos inmunológicos. Se basan en la especificidad de la reacción antígeno/anticuerpo. Se trata, por tanto, de producir anticuerpos dirigidos contra estructuras o moléculas específicas de un microorganismo o grupo de microorganismo.

Para la inmunofluorescencia los anticuerpos están conjugados con compuestos fluorescentes. La fluorescencia producida por el anticuerpo unido a su antígeno se detecta con un citómetro de flujo o con un microscopio de fluorescencia.

Para el ensayo de inmunoabsorbente unido a un enzima (comunmente conocido como ELISA) los anticuerpos están adsorbidos a un soporte sólido, el plástico de las placas de microtitulación. Un segundo anticuerpo, que reconoce al primero, está conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, que en presencia de los sustratos adecuados produce una reacción de color fácilmente medible con un espectrofotómetro.

Para los ensayos de aglutinación se aprovecha esta capacidad intrínseca de los anticuerpos. Se trata de partículas de latex recubiertas por anticuerpos que al unirse al antígeno se aglutinan y precipitan.

Los inmunoensayos magnéticos utilizan partículas férricas recubiertas por el anticuerpo, las cuales se separan en un campo magnético y se prueban para la presencia del microorganismo diana.

Ensayos con ácidos nucleicos. Se basan en la detección de las diferencias en secuencia que hay entre los ácidos nucleicos de los microorganismos. Dos son los métodos empleados, las hibridaciones y las amplificaciones. Ambos, aunque distintos, se basan en el principio general de la complementación de bases de los ácidos nucleicos. Esto es, dos ácidos nucleicos de cadena simple se pueden unir para formar una estructura de doble cadena si sus secuencias son total o parcialmente complementarias y si las condiciones de temperatura y concentración salina son adecuadas. El objeto final es lo que distingue ambos métodos, puesto que la hibridación persigue tan solo la formación de esa estructura de doble cadena y la amplificación persigue la formación de un molde, requisito necesario para duplicar cualquier ácido nucleico. Las técnicas de hibridación utilizan sondas de ADN para detectar ADN o ARN. La hibridación se detecta porque las sondas se marcan con compuestos radiactivos, fluorescentes o antigénicos. Por su parte, las técnicas de amplificación se basan en la producción exponencial de un fragmento de ADN utilizando un molde de ADN o ARN.

La amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR se ha desarrollado recientemente y ha revolucionado todos los campos de la Biología, desde la ecología hasta, por supuesto, la microbiología alimentaria. Su importancia reside en la capacidad de producir de manera altamente específica una cantidad detectable de ADN a partir de una cantidad infinitesimal.

La PCR es una reacción cíclica que consta de tres etapas: desnaturalización, hibridación y polimerización. La repetición de cada una de esas etapas permite amplificar exponencialmente cualquier secuencia de ADN. Así, a partir de una única secuencia diana se pueden llegar a obtener hasta 1,5 millones de copias en tan sólo 30 ciclos. La PCR es una reacción de síntesis de ADN tal como ocurre en los seres vivos, pero la desnaturalización se produce por calor y los cebadores son oligonucleótidos sintéticos. Además, debido a la alta temperatura que alcanza la reacción, se utiliza una ADN polimerasa termoestable. Cuando la diana que se quiere amplificar es un ARN, es necesario utilizar la retrotranscriptasa para convertir el molde de ARN en un ADN complementario de cadena sencilla.

1.7. Objetivos de la Tesis.

Actualmente, el control microbiológico de los alimentos se realiza por medio de los métodos tradicionales basados en el cultivo de microorganismos. Estos métodos son bastante lentos, lo que obliga al almacenamiento del producto final recién elaborado hasta completar su control microbiológico. El almacenamiento supone un costo adicional en la producción, ya que el producto permanece inmobilizado en la fábrica durante un periodo de 12 a 15 días.

El objetivo general de esta Tesis ha sido desarrollar un método molecular para la detección de *Salmonella* y *Shigella* en mayonesa. El método molecular elegido fue la amplificación de ADN mediante PCR, la cual nos planteó los siguientes objetivos particulares:

- a) diseñar una pareja de oligonucleótidos que sirvan como cebadores en la PCR para la detección de las bacterias del género *Salmonella*.
- b) diseñar una pareja de oligonucleótidos que sirva como cebadores en PCR para la detección de las bacterias del género *Shigella*.
- c) determinar la especificidad, y el nivel de detección de la PCR empleando las parejas de cebadores diseñadas.
- d) aplicar el método de PCR para la detección de *Salmonella* y *Shigella* en mayonesa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento.

Los microorganismos empleados en esta tesis se citan en la Tabla 4. La composición de los medios o caldos empleados en su crecimiento (en g/L) se presentan a continuación:

Caldos de Luria-Bertani según fórmula de Miller (LB)	
Extracto de levadura	5
Peptona	10
Cloruro sódico	10
Ajustado a pH 7,2.	
Caldos Nutritivos II (CN II)	
Extracto de carne	1
Extracto de levadura	2
Peptona	5
Cloruro sódico	5
Ajustado a pH 7,2.	
Caldos Nutritivos I (CN I)	
Extracto de carne	10
Peptona	10
Cloruro sódico	5
Ajustado a pH 7,2.	
Caldos YEPD	
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glucosa	20
Ajustado a pH 5,5.	
Caldos MRS	
Proteosa peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Tween 80	1
Citrato amónico	2
Acetato sódico	5
Sulfato magnésico	0,1
Sulfato manganesico	0,005
Fosfato dipotásico	2
Ajustado a pH 6,5.	

Los medios sólidos se prepararon a partir de los caldos, añadiéndoles agar (15 g/L). Para esterilizar los medios se empleó el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Tabla 4. Microorganismos empleados en esta tesis.

ESTIRPE	ORIGEN	NÚMERO	MEDIO/Tª(°C)
BACTERIAS			
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	CECT ^a	449	CN I/26
<i>Alcaligenes faecalis</i>	CECT	145	CN I/37
<i>Arthrobacter oxydans</i>	CECT	386	CN II/26
<i>Arthrobacter</i> sp.	A.M.	1A	CP/30
<i>Bacillus</i> sp.	CECT	450	CN I/27
	A.M.	1B	CP/37
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT	684	CN I/30
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT	481	CN I/37
<i>Escherichia</i>			LB/37
<i>E. coli</i> DH5a	Gibco BRL		
<i>E. coli</i> HB101	Gibco BRL		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene		
<i>E. coli</i> O:1	CECT	515	
<i>E. coli</i> O:124	G.P. ^b	120	
		121	
<i>E. coli</i> O:28	G.P.	41	
		42	
<i>E. coli</i> O:127	M.D. ^c	E2348/69	
<i>E. coli</i> O:111	M.D.	B171	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT	852	CN I/37
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	CECT	562	MRS/30
<i>Lactobacillus sake</i>	CECT	906	MRS/30
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT	241	CN I/30
<i>Mycobacterium phlei</i>	CECT	3009	CN I/37
<i>Proteus vulgaris</i>	CECT	484	CN I/37
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT	378	CN II/26
<i>Salmonella</i>			LB/37
<i>S. abony</i>	CECT	545	
<i>S. agona</i>	CECT	705	
<i>S. blockey</i>	J.C.P. ^d	11	
		40	
<i>S. braenderup</i>	CECT	921	
<i>S. bredeney</i>	CECT	708	
<i>S. daressalaam</i>	CECT	4000	
<i>S. dublin</i>	J.C.P.	1	
		29	
		30	
<i>S. enteritidis</i>	J.C.P.	14	
		16	
		17	
		90	
<i>S. infantis</i>	CECT	700	
<i>S. minnesota</i>	CECT	456	
<i>S. montevideo</i>	J.C.P.	6	
		10	
		13	
		15	
		37	
		46	
<i>S. panama</i>	J.C.P.	20	
		39	
<i>S. paratyphi</i> A	CECT	825	
<i>S. paratyphi</i> B	CECT	884	
<i>S. paratyphi</i> C	CECT	699	
<i>S. typhimurium</i>	J.C.P.	2	
		12	
		28	

Tabla 4 (continuación). Microorganismos empleados en esta tesis.

ESTIRPE	ORIGEN	NÚMERO	MEDIO/T ^a
<i>Serratia marcescens</i>	CECT	159	CN II/26
<i>Shigella</i>			LB/37
<i>S. boydii</i>	CECT	583	
	J.C.P.	236	
		238	
<i>S. dysenteriae</i>	CECT	584	
	J.C.P.	193	
		300	
<i>S. flexneri</i>	CECT	585	
	J.C.P.	295	
		299	
<i>S. sonnei</i>	CECT	457	
		542	
	J.C.P.	296	
		298	
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT	240	CN I/37
<i>Staphylococcus</i> sp.	A.M.	1S	CP/37
<i>Yersinia enterocolitica</i>	G.K. ^e		CN I/37
<i>Yersinia pestis</i>	E.C. ^f		CN/28
HONGOS			
<i>Cryptococcus</i> sp.	A.L. ^g		YEPD/24
<i>Pichia fermentans</i>	CECT	1455	YEPD/24
<i>Rhodotorula</i> sp.	A.L.		YEPD/24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A.L.		YEPD/24
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	A.L.		YEPD/24

^aColección Española de Cultivos Tipo.

^bEstirpes amablemente cedidas por el Dr. G. Prats del Hospital de Sta. Creu i Sant Pau. Barcelona.

^cEstirpes amablemente cedidas por el Dr. M. Donnenberg del Divn of Infectious Diseases. Univ. Maryland School of Medicine. Baltimore (EE.UU.).

^dEstirpes amablemente cedidas por el Dr. J.C. Palomares del Dpto. Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

^eEstirpe amablemente cedida por el Dr. G. Kapperud del National Institute of Public Health. Oslo (Noruega).

^fEstirpe amablemente cedida por la Dra. E. Carniel del Institut Pasteur. Paris (Francia).

^gAislamiento del Dpto. Microbiología, Fac. Biología, Univ. Sevilla. Sevilla.

2.2. Aislamiento de microorganismos de muestras de mayonesa.

El aislamiento se realizó diluyendo (1/10) la muestra de mayonesa (Ybarra) en agua de peptona, agitando vigorosamente hasta la completa homogenización e inoculando alícuotas de 1 mL en medio de recuento en placa. Unas placas se incubaron a 30°C y otras a 37°C, se incubó durante tres días y las colonias aparecidas se sembraron, de nuevo y por zonas, en el medio de recuento en placa.

Las células de las colonias seleccionadas fueron observadas al microscopio (Photomicroscopell, Zeiss), bien *in vivo* o teñidas por el método de Gram (Gerhart, *et al.*, 1981).

La composición de los medios empleados es (en g/L):

<u>Agua de peptona tamponada</u>	
Peptona	10
Cloruro sódico	5
Tampón fosfato	10
<hr/>	
Ajustado a pH 7,2.	
<u>Agar de recuento en placa (CP)</u>	
Extracto de levadura	2,5
Triptona	5
Glucosa	1
Agar	9
<hr/>	
Ajustado a pH 7,2.	

2.3. Ensayos serológico y bioquímicos.

El ensayo serológico para la identificación de *Salmonella* se hizo con la prueba BioSign *Salmonella* (PBM). Para realizarlo bastó con añadir 150 µL de un cultivo enriquecido en la ventana de la muestra y leer el resultado.

La prueba bioquímica para la identificación de *Salmonella* se realizó con el método Api 20 E (bioMérieux), para la determinación de enterobacterias y otros bacilos gram negativos. Para ello, se hizo una suspensión bacteriana homogénea a partir de una colonia crecida durante la noche en medio sólido. A continuación, se rellenó con una gota de la suspensión cada uno de los tubos de la galería y se incubó a 37° durante 24 h. La lectura se realizó con la ayuda de una tabla de guía.

El ensayo de producción de ácido a partir de glucosa se realizó creciendo a 37°C durante 2 semanas la estirpe bacteriana en anaerobiósis, en el medio sólido de Hugh y Leifson, modificado para *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Harrigan y McCance, 1966).

La composición del medio Hugh y Leifson (para un litro) se muestra a continuación:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
D-glucosa	10 g
Púrpura de bromocresol (solución al 1% p/v)	4 mL
agar	2 g
<hr/>	
Ajustado a pH 7.	

Las condiciones de anaerobiósis se consiguieron añadiendo parafina líquida en el tubo de crecimiento.

2.4. Determinación del tiempo de generación.

Para realizar el cálculo, las bacterias se crecieron a 37°C, sin agitación, en agua de peptona tamponada y durante la fase exponencial de la curva de crecimiento, aplicando la fórmula (Ray, 1996):

$$\text{Tiempo de Generación} = \frac{0,3t}{\log z - \log x}$$

En donde z es el número inicial de células, x es el número final y t es el tiempo que dura el experimento.

Para tener un cultivo en fase exponencial, se partió de un preinóculo de células que habían estado creciendo durante 12 h. A partir de ahí, se inocularon 100 µL de preinóculo en 50 mL de medio precalentado y se incubó durante 8 h.

A partir de la segunda hora de crecimiento, se tomaron cada 30 min alícuotas de 1 mL de cultivo y se determinó la concentración de células.

2.5. Determinación de la concentración de células.

Se tomó 1 mL del medio que contenía las células y se hicieron diluciones en serie y de 10 en 10, en agua de peptona. De las diluciones seleccionadas se tomaron 100 µL (a menos que se indique lo contrario), se les

añadió 700 μ L de agua de peptona y se inoculó en placas con medio sólido LB (esto se hizo por cuadruplicado). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche y entonces se contaron las colonias crecidas en cada caja. La concentración de células se determinó tomando el recuento de las placas con 25-250 colonias, expresándose como media \pm desviación estándar y teniendo en cuenta su factor de dilución. Con este valor se obtuvo el número de células por mililitro (cél/mL).

2.6. Preparación de las muestras de células.

Las muestras se prepararon inoculando las células de una colonia, crecidas en medio sólido, en 50 μ L agua, TE o agua de peptona y se hirvieron durante 5 min.

Las muestras de mayonesa se prepararon con 5 g de mayonesa diluida hasta 50 mL con agua de peptona, homogeneizando e inoculando con 100 μ L de un cultivo de células crecidas en medio líquido. La mayonesa inoculada se empleó, directamente, en PCR o para determinar el número de células.

2.7. Aislamiento del ADN genómico de bacterias.

Se siguió el método empleado por (Ausbel, *et al.*, 1994), aunque con ligeras modificaciones.

Las bacterias se cultivaron en las condiciones adecuadas (ver Tabla 4) hasta alcanzar la fase estacionaria, posteriormente se precipitaron por centrifugación y se lisaron a 37°C durante 1 h, en una solución 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 0,5% (p/v) SDS y 100 mg/mL proteinasa K. A continuación se añadió NaCl y CTAB hasta una concentración final de 0,7 M y 1% (p/v) respectivamente, incubándose la muestra a 65°C durante 10 min.

Las proteínas y restos celulares se eliminaron añadiendo a la muestra un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamílico (reactivo de Holmes-Bonner, que es una mezcla 25:24:1 de fenol:cloroformo: alcohol isoamilico), mezclando vigorosamente, centrifugando y tomando la fase acuosa. Cada paso se repitió

3 o 4 veces. Para eliminar posibles restos de fenol, la muestra se mezcló vigorosamente con un volumen igual de cloroformo-isoamílico (mezcla 24:1 cloroformo: alcohol isoamílico), se centrifugo y se tomó nuevamente la fase acuosa.

El ADN se precipitó añadiendo 0,6 veces el volumen de la fase acuosa en alcohol isopropílico, incubándose a -20°C durante 1h, centrifugándose durante 30 min y eliminando el etanol. Después se lavó dos veces añadiendo etanol 70% (v/v) y centrifugando para eliminar completamente el etanol.

Finalmente, el precipitado de ADN se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris pH 8, 0,1 mM EDTA pH 8), conteniendo 1 mg/mL ARNasa A para degradar el ARN contaminante.

2.8. Aislamiento del ADN genómico de levaduras.

Se empleó el método seguido por (Kaiser, *et al.*, 1994). Para ello las células se cultivaron en las condiciones adecuadas (ver Tabla 4) hasta la fase estacionaria, posteriormente se centrifugaron y sus paredes celulares se degradaron a 37°C durante 1 h, en una solución 0,9 M sorbitol, 0,1 M EDTA pH 8, 0,1% (v/v) β-mercaptoetanol y 50 µg/mL zimolasa 20 T. Las células sin pared se precipitaron por centrifugación y se lisaron a 65°C durante 30 min, en una solución 50 mM Tris pH 8, 20 mM EDTA pH 8 y 0,5% (p/v) SDS. Transcurrido ese tiempo, los restos proteínicos y celulares se eliminan con la solución de Holmes-Bonner tal como se explicó anteriormente (página x). Finalmente el ADN se precipitó añadiendo dos veces el volúmen de la muestra en etanol y NaCl hasta una concentración final de 0,2 M, incubando a -20°C y centrifugando 30 min. Tras los lavados con etanol 70% (v/v), el ADN se resuspendió en TER (ver “Preparación de ADN total de bacterias”, página x).

2.9. Aislamiento del ADN plasmídico.

Se siguieron dos métodos diferentes, el primero empleó el "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Boehringer) que se describe a continuación:

1. Tomar un cultivo de células crecidas en el medio apropiado hasta la fase estacionaria y centrifugar 1, 5 mL. En este caso el medio utilizado fue LB, conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina.
2. Resuspender las células en 250 μL de la solución I (50 mM Tris, 10 mM EDTA y 1 mg/mL ARNasa A, a pH 8).
3. Lisar añadiendo 250 μL de la solución II (0,2 M NaOH, 0,1 % (p/v) SDS) incubando 5 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 350 μL de la solución III (4 M guanidina hidroclicrica y 0,5 M acetato potásico), incubar 5 min en hielo y centrifugar durante 10 min.
5. Colocar el sobrenadante sobre una microcolumna de sílice, centrifugar durante un minuto y descartar el flujo que pasa a través de la columna.
6. Añadir 500 μL de la solución IV (5M guanidina hidroclicrica 20 mM Tris pH 6,6 y 35% (v/v) etanol), centrifugar durante 1 min y descartar de nuevo el flujo.
7. Añadir 100 μL de la solución V (10 mM Tris pH 8 y 0,1 mM EDTA pH 8), centrifugar durante 1 min y tomar el flujo que pasa por la columna.

El segundo método (miniprep), aunque con variaciones, fue la lisis alcalina descrito en (Sambrook, *et al.*, 1989). Para ello, las células se cultivaron en el medio adecuado a 37°C y en agitación hasta la fase estacionaria. Posteriormente, 1,5 ml de cultivo se centrifugaron y se resupendió en 100 μL de una solución 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8 y 50 mM glucosa. Después, se añadió 200 μL de una solución 0,2 N NaOH y 1% (p/v) SDS y se incubó en hielo durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió 150 μL de una solución 5 M acetato y 3 M K^+ y se incubó otros 5 min en hielo. El precipitado de aspecto lechoso que se forma, se eliminó centrifugando durante 5 min y tomando el sobrenadante. El ADN contenido en ese sobrenadante se precipitó añadiendo 1 mL de etanol, incubando 5 min en hielo y centrifugando

20 min. Tras la precipitación, el ADN plasmídico se lavó dos veces en etanol 70% (v/v), como ya se ha explicado anteriormente (página xx), y se resuspendió en 25 μ L de TER.

2.10. Purificación de ADN de geles de agarosa.

El fragmento de ADN, previamente separado en gel de agarosa, se extrajo utilizando el “Agarose gel DNA extraction kit” (Boehringer), tal como sigue:

1. Escindir el fragmento de agarosa, pesarlo y añadir solución de solubilización (proporción 300:100 μ L solución:mg de agarosa).
2. Añadir 10 μ L de una suspensión conteniendo partículas de sílice e incubar a 55°C durante 10 min, con agitaciones frecuentes. Centrifugar 30 s y descartar el sobrenadante.
3. Añadir 500 μ L de la solución de unión del ADN y agitar. Centrifugar 30 s y eliminar el sobrenadante.
4. Añadir 300 μ L de solución de lavado. Centrifugar y descartar el sobrenadante.
5. Añadir TE, incubar a temperatura ambiente durante 10 min y con agitación frecuente. Centrifugar durante 1 min y tomar el sobrenadante.

2.11. Purificación de ADN en microcolumna.

Se empleó el “High pure PCR product purification kit” (Boehringer), siguiendo las instrucciones, tal como se expone a continuación:

1. Añadir 250 μ L de solución I (3M tiocianato de guanidina, 10 mM Tris y 5%(v/v) etanol, a pH 6,6) a 50 μ L de reacción de PCR.
2. Depositar sobre una microcolumna que contiene partículas de sílice, centrifugar 30 s y descartar el flujo que pasa a través de la columna.
3. Añadir 500 μ L de solución II (2 mM Tris, pH 7,5, 20 mM NaCl, 77%(v/v) etanol), centrifugar y descartar de nuevo el flujo.

4. Añadir 200 mL de solución II, centrifugar y descartar también el flujo.
5. Añadir 50 mL de TE, centrifugar 1 min y tomar el flujo que pasa a través de la columna.

2.12. Electroforesis del ADN en gel de agarosa.

Las electroforesis de los ADN genómicos y plasmídicos se realizaron en geles de agarosa (SeaKem LE, FMC) a concentraciones entre el 0,7-1% (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN que se quisieran visualizar (Sealey, y Southern, 1982), en tampón TBE (128 mM Tris, 24 mM ácido bórico y 42 mM EDTA). Estos fragmentos se visualizaron gracias a la fluorescencia emitida a 240 nm por el bromuro de etidio (BrEt), un agente intercalante de ADN. El bromuro de etidio se añadió al gel de agarosa a una concentración de 0,8 mg/mL. Los fragmentos de ADN, resuspendidos en tampón de carga (0,25% (p/v) azul de bromofenol, 0,25% (p/v) xilen cyanol FF en 30% (v/v) glicerol, se separaron por tamaño cuando se les cargó en el gel y se aplicó un voltaje entre 60-90 V. El tamaño de los fragmentos se calculó utilizando como referente ADN del fago lambda (Boehringer) cortado con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Boehringer). Esos fragmentos de restricción tienen un tamaño conocido y se utilizan como marcadores.

Las electroforesis del ADN amplificado por PCR se realizó tal como se acaba de describir exceptuando que los geles de agarosa (NuSieve, FMC) fueron al 2% (p/v) y que el marcador de talla empleado fue una mezcla de fragmentos de ADN que va desde 100 hasta 1500 pb, de 100 en 100 pb (Boehringer).

La electroforesis del ADN obtenido en las reacciones de secuenciación se realizó en geles de poliacrilamida al 4% (p/v) (solución 19:1 acrilamida:bis-acrilamida), 8 M urea y en TBE. Se empleó un método vertical de electroforesis (Beck y Phol, 1984) aplicando al gel una corriente de 30 W.

Las imágenes de las electroforesis de ADN se tomaron mediante una cámara de video acoplada a una computadora con un programa informático de

captura de imágenes (Gelstation, TDI). Las imágenes se analizaron con el programa Photoshop 3.0, Adobe.

2.13. Cuantificación del ADN.

Se hizo usando un espectrofotómetro (UltrospecIII, Pharmacia), tomando dos medidas, una a 280 nm y otra a 260 nm. La relación 280/260 nos dio una idea del grado de pureza del ADN, puesto que si este valor es próximo a 1,8, la preparación es muy pura. El valor de la absorbancia a 260 nm nos sirvió para estimar la cantidad de ADN utilizando la relación (Sambrook, et al., 1989):

1 unidad de absorbancia a 260nm = 50 µg/mL ADN doble cadena.

2.14. Amplificación del ADN por PCR.

Las reacciones se realizaron (Saiki, 1990) en un volumen de 50 µL conteniendo ADN molde, 25 pmoles de cada cebador, 200 µM dNTP, 2,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa, 10 mM Tris pH 9,3, 50 mM KCl y 1,5 mM MgCl₂, recubierto todo por aceite mineral (Sigma). Los ciclos de temperaturas se realizaron en un termociclador (MiniCycler PTC-150, MJ Research) y fueron:

94°C, 4 min	
65°C, 30 s	1 ciclo
72°C, 30 s	
94°C, 30s	
65°C, 30 s	35 ciclos
72°C, 30 s	
72°C, 10 min	1 ciclo

Como ADN molde se utilizaron las células enteras, lisados celulares o el ADN genómico de los microorganismos estudiados. Los cebadores fueron oligonucleótidos sintéticos (MWG o Gibco), cuyas secuencias y características más relevantes se muestran en la Tabla 5. Los dNTP fueron una mezcla, a la concentración arriba indicada, de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos del

ADN: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Rutinariamente, la *Taq* polimerasa empleada fue de la casa comercial Pharmacia, aunque también se empleó la preparada por Boehringer, obteniéndose resultados parecidos.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR.

Nombre del cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Contenido G+C (%)	T _m * (°C)
16SF	AGA CTG CTA CGG GAG GCA GCA GT	23	60	74
16SR	GTT GCGCTC GTT GCG GGA CTT AA	23	56	72
IS200F	GCC GAA GAT GAG TGT GTC GAG TT	23	57	72
IS200R	TTC GCC GTG TTC TTA CCC ACC GT	23	52	70
VIRAF	CTG CAT TCT GGC AAT CTC TTC ACA TC	26	46	76
VIRAR	TGA TGA GCT AAC TTC GTA AGC CCT CC	26	50	78

*Se calculó asumiendo 4°C por G o C y 2°C por A o T.

El nivel de detección se analizó de dos formas distintas, a saber, la cantidad mínima de ADN y el número mínimo de células, con los que se obtiene amplificación. Para averiguar si en una reacción de PCR se produjo amplificación, el ADN se detectó de tres maneras diferentes: en gel de agarosa, por hibridación y mediante inmunoensayo enzimático.

Para obtener diferentes cantidades de ADN, las preparaciones se diluyeron en serie y en TE hasta obtener diferentes cantidades (en gramos por microlitro). Para los ensayos de PCR, la cantidad de ADN deseada se diluyó a la mitad en agua, empleándose 2 μ L para la reacción. Así, se consiguió diluir la cantidad de EDTA en la reacción a la mitad, esto es, de 0,1 mM hasta 0,05 mM. Para determinar si se produjo amplificación se tomó la mitad del volumen de reacción (25 μ L) y se averiguó si hubo amplificación detectando la presencia de ADN en gel de agarosa, por hibridación o por inmunoensayo enzimático.

Para obtener un número diferente de células se tomó una colonia y se diluyó en 1 mL de agua de peptona. A continuación se hicieron diluciones, en series de 10 en 10, con agua de peptona. De las diluciones se tomaron 5 μ L para las reacciones de amplificación y para determinar, en placa el número de células. En este último caso, los 5 μ L se completaron con otros 600 mL de

agua de peptona para un mejor esparcimiento de las células en el medio sólido. Tras la PCR, 25 μ L de la reacción se analizaron en un gel de agarosa.

2.15. Clonación del ADN.

2.15.1. Ligación del ADN.

Se realizó a 15°C durante 3h, en una mezcla de reacción de 10 μ L que contuvo 30 mM Tris pH 7,5, 10 mM ditiotreitól, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 50 ng de pGEM-T (Promega, Robles y Doers, 1994), 1 unidad de T4 ligasa (Promega) y una cantidad variable de ADN. Previamente, el ADN fue purificado en un gel de agarosa o a través de microcolumna, tal como se explicó.

El plásmido pGEM-T deriva del pGEM-5Zf(+), el cual se ha cortado con la enzima *EcoRV* y al cual se le añadió deoxitimidina en sus extremos 3', mediante una terminal transferasa.

2.15.2. Preparación de células competentes.

Se siguió el método empleado por Inoue, *et al.*, 1990, pero utilizando la estirpe de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene). Esta estirpe se creció en medio sólido (LB suplementado con 10 mg/mL de tetraciclina) a 37°C durante 10-12 horas, tras lo cual una colonia se inoculó en medio SOB (5 g/L extracto de levadura, 20 g/L triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MgSO₄, a pH 7). El inóculo se incubó en agitación a 22°C, hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm, y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó, las células precipitadas se resuspendieron suavemente en una solución fría TB (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂ y 250 mM KCl, a pH 6,7) y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó, las células precipitadas se resuspendieron en TB frío y se incubó 10 min en hielo, nuevamente. Se añadió dimetil sulfóxido hasta una concentración final del 7% (v/v), las células se distribuyeron en alícuotas, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.15.3. Transformación de las células competentes (Sambrook, *et al.* 1989).

En primer lugar, se completó hasta 100 μ L el volumen de la reacción de ligación y después se añadió todo el volumen a un vial con 200 μ L de células competentes, previamente descongelado. La mezcla se dejó 1 h en hielo y a continuación se sometió a un choque térmico, 42°C durante 90 s. Tras el choque térmico las células se mantuvieron 2 min en hielo, se les añadió 100 μ L de medio LB líquido y se incubó a 37°C durante 45 min, agitando suave y regularmente. Transcurrido ese tiempo se inoculó, con 100 μ L por placa, en medio sólido LB-Ap, suplementado con 250 mg/mL de X-Gal y 2,5 mg/mL de IPTG. Las células se cultivaron a 37°C durante 10-12 horas.

De todas las colonias transformadas aparecidas en el medio sólido, se seleccionaron las que eran de color blanco, las cuales se inocularon en LB-Ap. El inóculo se incubó a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria y a continuación se sometió a la extracción del ADN plasmídico mediante miniprep.

El ADN plasmídico se sometió a digestión con las enzimas *Apal* y *SacI* (Boehringer) a 30°C durante 3 h. Pasado ese tiempo se realizó una electroforesis en gel de agarosa para separar el ADN plasmídico y el insertado.

2.16. Secuenciación del ADN.

Se empleó tanto el Servicio de secuenciación automática de ADN de la Universidad de Valencia como la secuenciación manual.

El ADN plasmídico enviado al Servicio de secuenciación se purificó utilizando el "High pure plasmid isolation kit".

Con el método de secuenciación manual se empleó ADN plasmídico aislado mediante miniprep y el "Dig Taq sequencing kit" para la reacción de secuenciación por el método cíclico (Innis, *et al.*, 1989) con cebadores marcados, tal como indica el proveedor (Boehringer). Primero, se mezclaron los siguientes componentes en un tubo:

10 μL ADN plasmídico (50 fmol a 1 pmol)
1 μL cebador (1 pmol, M13-Dig o M13-Dig reverso)
2 μL tampón (100 mM Tris, 500 mM KCl y 15 mM MgCl_2 , a pH 8,3)
1 μL Taq ADN polimerasa (3 U/ μL)
6 μL agua destilada

Después, se añadió a tubos nuevos 2 μL de una mezcla de terminación, que es diferente para cada uno de los 4 tubos empleados. Las mezclas de terminación contuvieron:

Mezcla A: dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP (a 25 μM cada uno), 850 μM ddATP y 950 μM MgCl_2 , pH 7,5.

Mezcla G: dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP (25 μM cada uno), 75 μM ddGTP y 175 μM MgCl_2 , pH 7,5.

Mezcla C: dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP (25 μM cada uno), 400 μM ddCTP y 500 μM MgCl_2 , pH 7,5.

Mezcla T: dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP (25 μM cada uno), 1275 μM ddTTP y 1370 μM MgCl_2 , pH 7,5.

A cada uno de esos 4 tubos (A; G; C; T) se les añadió 4 μL de la mezcla de reacción, se recubrieron con una gota de aceite mineral y se incubaron en el termociclador, con los siguientes ciclos de temperatura:

94°C, 4 min	
60°C, 30 s	1 ciclo
72°C, 1 min 24 s	
94°C, 30s	
60°C, 30 s	24 ciclos
72°C, 1 min 24 s	

Finalizada la reacción a cada tubo se le añadió 2 μL de tampón de parada, 98% (v/v) formamida desionizada, 10 mM EDTA pH 8, 0,025% (p/v) azul de bromofenol y 0,025% (p/v) xilen cyanol FF. Al final, el ADN se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirió a membrana y se detectó colorimétricamente.

2.17. Transferencia del ADN a membrana.

Tres métodos se emplearon para unir o transferir ADN a membrana. El primer método ("dot blotting", Parnes, *et al.*, 1981) consistió en depositar directamente en la membrana de nylon (Hybond, Amersham) una pequeña cantidad del ADN (2-5 μ L), dejar secar y fijar el ADN a la membrana.

En el segundo método ("southern blotting", Southern, 1975) tras la separación del ADN en gel de agarosa, se trató con una solución 0,25 M de HCl durante 15 min y se lavó dos veces con agua destilada. Hecho este tratamiento, el ADN se transfirió desde el gel a la membrana de nylon por presión, utilizando el sistema "Vacuum blotter 785" (BioRad). La transferencia se realizó en una solución 0,5 M NaOH durante 1 h a 12,7 cm de Hg de presión. Finalmente, la membrana se lavó en 2XSSC (1XSSC: 15 mM citrato sódico y 150 mM cloruro sódico) durante 5 min y el ADN se fijó a ella.

El tercer método ("DBE, direct blotting electrophoresis", Beck y Phol, 1984) se empleó para la transferencia desde un gel de poliacrilamida. Cuando el azul de bromofenol llegó al final del gel, se inició la transferencia a una membrana de nylon (MWG) de 40 cm de largo, gracias a un aparato de electroforesis y transferencia directa (GATC-1500, MWG). La membrana se colocó sobre la cinta transportadora del aparato, la cual se movió, controlada por un ordenador, de la siguiente manera:

15-18* cm/h, 8 cm

18,5-19,5 cm/h, 25 cm

19,5-21,5 cm/h, 7 cm

*se quiere indicar un aumento
lineal de la velocidad.

Tras la transferencia la membrana se fijó con luz ultravioleta. La fijación, en todos los casos, se llevó a cabo irradiando la membrana 2 min con luz ultravioleta a 264 nm.

2.18. Marcaje del ADN.

Se utilizó ADN plasmídico que se marcó mediante amplificación por PCR (Lanzillo, 1990), tal como se describe en la sección Amplificación del ADN por PCR (página xx), excepto que se utilizó una mezcla de dNTP con una composición y concentración diferentes (100 μ M de dATP, dGTP, dCTP, 65 μ M de dTTP y 35 μ M de Dig-dUTP).

2.19. Hibridación ADN/ADN.

El ADN unido a membrana se hibridó con la sonda de ADN marcada con Dig. Primero, se incubó la membrana a 65°C durante 3 h, al menos, en una solución 5XSSC, 0,1% (p/v) SDS y 1% (p/v) reactivo de bloqueo (Boehringer). A continuación se le añadió la sonda marcada con Dig y se incubó al menos 2 h a esa misma temperatura. Transcurrido ese tiempo, se eliminó la solución conteniendo la sonda y se lavó dos veces a 65°C durante 15 min en 2XSSC y 0,1% (p/v) SDS, y otras dos veces a temperatura ambiente durante 15 min en 0,1XSSC y 0,1% (p/v) SDS. Finalmente, la membrana se equilibró en tampón maleico (10 mM ácido maleico y 150 mM cloruro sódico, a pH 7,5) y la sonda se detectó mediante color como se explicará en la sección Detección del ADN unido a membrana, en esta misma página.

2.20. Detección del ADN unido a membrana.

Para ello se empleó el "Dig DNA detection kit", siguiéndose el método colorimétrico (Holtke, et al., 1990) propuesto por el fabricante (Boehringer). La detección se realizó en un horno de hibridación a 30°C. Primero, la membrana se lavó durante 5 min en tampón maleico (10 mM ácido maleico y 150 mM cloruro sódico, a pH 7,5) y después se incubó 1 h en el mismo tampón pero con 1% (p/v) del reactivo de bloqueo. Transcurrido ese tiempo se le añadió el anticuerpo (5000:1 solución:anticuerpo) y se incubó 1 h. Descartada esa solución, se lavó en tampón maleico conteniendo 0,1% (v/v) Tween 20, dos veces durante 5 min y dos veces durante 10 min. Más tarde se equilibró en el

tampón de revelado (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl y 50 mM MgCl₂) durante 5 min. Finalmente, la reacción de color se realizó en 25 mL tampón de revelado conteniendo 68 µL de NBT (100 mg/mL) y 90 µL de BCIP (50 mg/mL).

2.21. Detección del ADN en pocillo.

Esta técnica es conocida como EIA (“enzyme immunoassay”). Para ello se empleó el “Dig ELISA detection kit” siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer).

Primero, se marcó el ADN con Dig por medio de amplificación (Lanzillo, 1990). El procedimiento es el mismo que para la PCR (página xx) pero sustituyendo el dNTP por la mezcla con Dig-dUTP. El ADN marcado se desnaturalizó con NaOH durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se mezcló con una sonda de captura biotinilada (las secuencias, junto con algunas características se muestran en la Tabla 6, página) a una concentración de 9 pmol/mL y en la solución de hibridación. La hibridación de la sonda de captura con el ADN marcado se realizó a 55°C durante 2 h y en los pocillos recubiertos de estreptavidina de una placa de microtitulación. Así, mientras se produjo la hibridación del ADN y la sonda, la biotina se unió a la estreptavidina. Finalizada la hibridación, los pocillos se lavaron 3 veces con la solución de lavado y se incubó a 37°C durante 30 min con un anticuerpo (dilución 1/99), que reconoce la Dig y está conjugado con la enzima peroxidasa. Al finalizar este periodo, se lavaron nuevamente los pocillos 3 veces con la solución de lavado y se añadió la solución que contiene el sustrato ABTS. Se incubó 35 min a 37°C, y se midió la absorbancia a 405 y 492 nm (Multiskan MS, Labsystems).

Los valores se expresaron en unidades arbitrarias dadas por la relación entre la absorbancia a 405 y 492 nm.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados como sondas de captura.

Nombre de la sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Contenido G+C (%)	Tm* (°C)
ISON	CTC CCT GTT CCT GTA TTT GAA	21	42	60
VSON	CGA CAC TGC AAT CTC TGC CTC T	22	55	68

*Se calculó asumiendo 4°C por G o C y 2° C por A o T.

2.22. Diseño de los cebadores y de las sondas.

Todo el proceso se hizo mediante programas de ordenador: GCG 9.1 y el Oligos 4.0.

Los comandos GCG (Devereux, et al., 1984) empleados fueron:

STRINGSEARCH: para buscar las secuencias en las bases de datos GenBank y EMBL.

PRIME: para seleccionar cebadores de PCR a partir de secuencias de nucleótidos.

FASTA: para comparar una secuencia con todas las secuencias de las bases de datos GenBank y EMBL. Muestra los emparejamientos y los porcentaje de homología.

El programa Oligos 4.0 se empleó para analizar la formación de posibles estructuras en los oligonucleótidos y entre ellos.

3. RESULTADOS

3.1. Diseño de los cebadores y las sondas.

La búsqueda de los oligonucleótidos utilizables como cebadores en la PCR se hizo en tres fases:

1. Búsqueda de una secuencia específica. Se buscaron todas las secuencias disponibles y de ellas se seleccionó la más específica, es decir, una secuencia que está presente sólo en un tipo de bacterias o en un grupo de bacterias emparentadas.
2. Selección de la secuencia del oligonucleótidos, *per se*. Se buscaron los oligonucleótidos que tuvieran los siguientes requisitos:
 - A) secuencia azarosa.
 - B) 40-60% de contenido en G+C.
 - C) 50-65°C de temperatura media de fusión.
 - D) 20-25 pb de longitud.
 - E) 100-500 pb de separación entre ellos.
3. Análisis de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos seleccionados anteriormente tuvieron que cumplir 3 requisitos más:
 - F) no formar estructuras terciarias interiores.
 - G) no emparjarse entre ellos.
 - H) no emparejarse con ninguna secuencia de los bancos de datos.

La secuencia específica que se escogió para *Salmonella* fue la secuencia de inserción, IS200, descrita en muchas de las serovariedades del género y en otras bacterias como *E. coli*, *S. sonnei* o *Yersinia pestis*. Sin embargo, existen suficientes diferencias entre las IS200 de *Salmonella* y de las otras bacterias como para encontrar regiones específicas. Esas regiones se emplearon para diseñar los oligonucleótidos. Para *Shigella* se escogió el gen *virA*, un gen del plásmido de virulencia, el cual se ha encontrado también en las estirpes enteroinvasivas de *E. coli*. El problema, en este caso, fue que el contenido G+C de las bacterias del género *Shigella* es bastante bajo (49-53%), lo que dificultó la búsqueda de oligonucleótidos con un contenido G+C cercano al 50%.

Salvadas las primeras dificultades, también se intentó que las parejas de cebadores produjeran productos de amplificación de pequeño tamaño, así la *Taq* ADN polimerasa los sintetizaría fácil y rápidamente. Además, se exigió que el producto de amplificación de *Salmonella* se diferenciara fácilmente por tamaño en gel de agarosa del producto de *Shigella*.

El resultado final fue que para *Salmonella* se seleccionó una pareja de oligonucleótidos de 23 pb cada uno y situados en la posición 429-451 (ISF) y en la posición 562-584 (ISR), respecto a la secuencia IS200 de *S. abortusovis* (número de acceso a GenBank: Y08755). Por tanto, una PCR con esos cebadores debía producir un fragmento de 150 pb. Para *Shigella* se escogió una pareja de cebadores de 26 pb cada uno, situados en las posiciones 1599-1624 (VIRAF) y 1788-1813 (VIRAR), respecto a la secuencia *virA* de *S. flexneri* (número de acceso a GenBank: D26468), es decir, que en los ensayos de PCR esperaríamos obtener un fragmento de ADN de unos 200 pb, aproximadamente.

Las búsqueda de las sondas se hizo tomando la secuencia de nucleótidos entre los cebadores y con algunos requerimientos: que la secuencia fuera azarosa, con una temperatura media de fusión entre 50-65°C, que no formaran estructuras secundarias internas y por supuesto que no emparejaran con otras secuencias del banco de datos.

3.2. Microflora inicial de la mayonesa.

A partir de distintos lotes de mayonesa Ybarra y por siembra directa en en placa, se asilaron y purificaron 20 microorganismos. Para determinar qué microorganismos se habían aislado, en primer lugar se observaron al microscopio para ver la morfología, el tamaño, la movilidad y se tiñeron siguiendo el método de Gram. Así, se establecieron inicialmente dos grandes grupos: levaduras (2 aislamientos) y bacterias gram positivas (18 aislamientos).

De los 18 aislamientos de bacterias gram positivas, se tomaron 9 (6 cocos y 3 bacilos) para analizarlos bioquímicamente. Los bacilos crecieron a 37°C y por ser formadores de endospora y crecer en aerobiosis, se agruparon

dentro del género *Bacillus*. Los seis aislamientos de morfología cocal crecieron en aerobiosis, fueron catalasa positivo y sensibles a la novobiocina (0,6 µg). Además, cinco de estos aislamientos crecieron a 37°C y con un 5% (p/v) de NaCl, lo que sugirió su pertenencia al género *Staphylococcus*. El sexto de los aislamientos en forma de coco tuvo una morfología irregular y creció a 30°C, pero no fue posible clasificarlo.

También se aisló el ADN de esos 9 tipos de bacterias para obtener las secuencias de ADN que corresponden al ARNr 16S. Esta molécula se ha empleado ampliamente para clasificar y establecer relaciones de parentesco entre los distintos seres vivos. Los cebadores para amplificar el ARNr 16 S se diseñaron teniendo en cuenta las regiones comunes y variables de los ARNr 16S de bacterianos (Amann, *et al.*, 1995). Para ello se seleccionaron la regiones comunes comprendidas entre los nucleótidos 338-355 y los nucleótidos 1088-1107, respecto a la secuencia de *E. coli* (número de acceso a GenBank: J01695). A partir de esas regiones se obtuvieron dos oligonucleótidos de 23 pb, localizados en las posiciones 336-358 (16SF) y 1090-1112 (ISR). Por tanto, con estos cebadores debería amplificarse por PCR un fragmento de aproximadamente 750 pb.

Las amplificaciones con ADN (100 ng) de las 9 estirpes seleccionadas se clonaron, secuenciaron y compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos (GenBank y EMBL). Los tres aislamientos presuntamente clasificados como *Bacillus* en base a las pruebas bioquímicas, mostraron idéntica secuencia. Para los posteriores análisis se tomó una de ellas (Figura 1) que presentó el mayor nivel de homología (98,5%) con la de *Bacillus cereus* (nº acceso a GenBank: D16266). También los ARNr amplificados a partir de los 5 cocos, clasificados bioquímicamente como *Staphylococcus*, presentaron la misma secuencia (Figura 2), que presentó la mayor homología (99,2%) con *Staphylococcus warneri* (nº de acceso a GenBank: L37603). La secuencia (Figura 3) correspondiente al ARNr del coco que no pudo clasificarse bioquímicamente, mostró una mayor homología (99,1%) *Arthrobacter polychromogenes*. Así, las secuencias de los ARNr 16S confirmaron las

determinaciones bioquímicas y además se clasificó como *Arthrobacter* al coco que no habíamos podido clasificar por las pruebas bioquímicas.

Figura 1. Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN correspondiente al ARNr 16S amplificado por PCR de *Bacillus* sp. 1 aislado de la mayonesa. Las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación se muestran en negrita.

```

      10              30              50
      .              .              .
AGACTGCTACGGGAGGCAGCAGTCTGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
      70              90              110
      .              .              .
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA
      130             150             170
      .              .              .
GTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
      190             210             230
      .              .              .
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
      250             270             290
      .              .              .
GCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC
      310             330             350
      .              .              .
ATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA
      370             390             410
      .              .              .
AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAC TGAC
      430             450             470
      .              .              .
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
      490             510             530
      .              .              .
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
      550             570             590
      .              .              .
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGC
      610             630             650
      .              .              .
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC TTACCAGGTCTTGA
      670             690             710
      .              .              .
CATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGC
      730             750             770
      .              .              .
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAGTCCCGCAACGAGCGCAAC

```

Figura 2. Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN correspondiente al ARNr 16S amplificado por PCR de *Staphylococcus* sp. 1 aislado de la mayonesa. Las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación se muestran en negrita.

```

      10              30              50
      .              .              .
AGACTGCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCTGACGGAGCA
      70              90              110
      .              .              .
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACAAA
      130             150             170
      .              .              .
TGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGT
      190             210             230
      .              .              .
GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCAGAATTATTGGGCGTAAAGC
      250             270             290
      .              .              .
GCGCGTAGGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
      310             330             350
      .              .              .
TGGAAACTGGAAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAA
      370             390             410
      .              .              .
TGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCG
      430             450             470
      .              .              .
TGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
      490             510             530
      .              .              .
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
      550             570             590
      .              .              .
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA
      610             630             650
      .              .              .
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCATTACCAAATCTTGAC
      670             690             710
      .              .              .
ATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA
      730             750             770
      .              .              .
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC

```

Figura 3. Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN correspondiente al ARNr 16S amplificado por PCR de *Arthrobacter* sp. 1 aislado de la mayonesa. Las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación se muestran en negrita.

```

      10              30              50
      .              .              .
AGACTGCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCTGATGCAGCG
      70              90              110
      .              .              .
ACGCCGCTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAA
      130             150             170
      .              .              .
AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
      190             210             230
      .              .              .
TAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGG
      250             270             290
      .              .              .
TCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGATCTGCCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGT
      310             330             350
      .              .              .
GATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTTGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAAC
      370             390             410
      .              .              .
ACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGA
      430             450             470
      .              .              .
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCAC'TAGGTGTGGGG
      490             510             530
      .              .              .
GACATTCACGTTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCGCCGCC'TGAGGAGTACGG
      550             570             590
      .              .              .
cCGCAAGCTAAAAC'TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGAT
      610             630             650
      .              .              .
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGTAATACCTGGAG
      670             690             710
      .              .              .
ACAGGTGCCCGCTTGCGGTCGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCG
      730             750
      .              .              .
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC

```

3.3. Especificidad de la PCR con los cebadores que amplifican IS200 y *virA*.

Los cebadores diseñados para *Salmonella* (ISF, ISR) se emplearon en reacciones de PCR utilizando 100 ng del ADN genómico aislado de la estirpe *Salmonella* 2 (*S. typhimurium*). Los ensayos se hicieron inicialmente a diferentes temperaturas de hibridación (50, 55, 60 y 65°C). Una alícuota, de 5

μL , de cada una de estas reacciones se cargó en el gel de agarosa, observándose en todos los casos un producto de amplificación de unas 150 pb (resultado positivo). A continuación, se realizaron diferentes reacciones de PCR tomando la temperatura de hibridación más restrictiva (65°C) y variando la concentración de MgCl_2 , obteniéndose en gel de agarosa producto de amplificación entre 1-2,5 mM de MgCl_2 (Figura 4). Las siguientes reacciones de amplificación se realizaron a 65°C de temperatura de hibridación y a 1,5 mM de MgCl_2 , tal como quedó establecido en Material y Métodos. Para ensayar estos cebadores con el ADN (100 ng) de otras estirpes de *Salmonella* se eligió la condición de temperatura más restrictiva, esto es 65°C . En esas condiciones, cargando 5 mL de las reacciones de amplificación en gel de agarosa, se obtuvo un resultado positivo con todas las estirpes, excepto con *S. montevideo* 6 (Tabla 7).

Figura 4. Efecto de la concentración de MgCl_2 en la amplificación del fragmento de la secuencia de inserción IS200. Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones con 100 ng ADN de *S. typhimurium* 2 y empleando diferentes concentraciones de MgCl_2 . Las reacciones de amplificación se realizaron empleando los cebadores ISF/ISR y se cargaron 5 μL en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. sin MgCl_2 ; 3. 0,5 mM MgCl_2 ; 4. 1 mM MgCl_2 ; 5. 1,5 mM MgCl_2 ; 6. 2 mM MgCl_2 ; 7. 2,5 mM MgCl_2 ; 8. marcador de 100 pb.

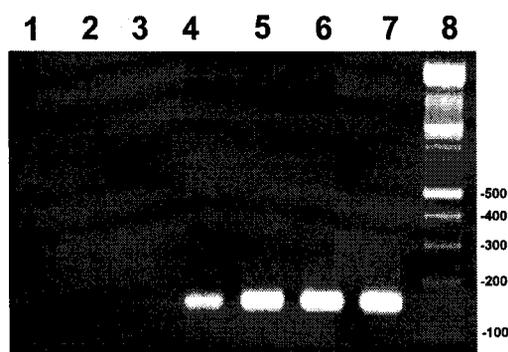


Tabla 7. Resultado de las ampliificaciones con los cebadores ISF/ISR, VIRAF/VIRAR y 16SF/16SR y empleando diferentes microorganismos. Los productos de amplificación se detectaron por electroforesis en gel de agarosa.

ESTIRPE	ISF/ISR	VIRAF/VIRAR	16SF/16SR
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	-	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	+
<i>Arthrobacter</i> sp.			
<i>Arthrobacter oxydans</i>	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+
Escherichia			
<i>E. coli</i> DH5a	-	-	+
<i>E. coli</i> HB101	-	-	+
<i>E. coli</i> XL1-Blue	-	-	+
<i>E. coli</i> O:1	-	-	+
<i>E. coli</i> O:124	-	+	+
<i>E. coli</i> O:28	-	+	+
<i>E. coli</i> O:127	-	-	+
<i>E. coli</i> O:111	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	-	-	+
<i>Lactobacillus sake</i>	-	-	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+
<i>Mycobacterium phlei</i>	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	+
Salmonella			
<i>S. abony</i>	+	-	+
<i>S. agona</i>	+	-	+
<i>S. blockey</i>	+	-	+
<i>S. braenderup</i>	+	-	+
<i>S. bredeney</i>	+	-	+
<i>S. daressalaam</i>	+	-	+
<i>S. dublin</i>	+	-	+
<i>S. enteritidis</i>	+	-	+
<i>S. infantis</i>	+	-	+
<i>S. minnesota</i>	+	-	+
<i>S. montevideo</i>	+ ^a	-	+
<i>S. panama</i>	+	-	+
<i>S. paratyphi B</i>	+	-	+
<i>S. paratyphi C</i>	+	-	+
<i>S. typhimurium</i>	+	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	+
Shigella			
<i>S. boydii</i>	-	+	+
<i>S. dysenteriae</i>	-	+	+
<i>S. flexneri</i>	-	+	+
<i>S. sonnei</i>	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+
<i>Staphylococcus</i> sp.			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	+
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	+
<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-

*Amplificación.

*No amplificación.

^aNo amplificó para la estirpe 6.

El resultado negativo en la estirpe *S. montevideo* 6 se verificó, utilizando temperaturas de hibridación menos restrictivas. Alícuotas de 25 μ L de las reacciones a 45, 50, 55 y 60°C de temperatura de hibridación tampoco produjeron producto de amplificación visible en gel de agarosa. Para comprobar si había amplificación, pero la cantidad del producto era tan baja que no se detectaba en el gel de agarosa, se tomó una alícuota de la reacción de PCR (2 μ L) y se utilizó como molde para una segunda reacción de PCR. En esta segunda reacción de PCR se emplearon como cebadores los oligonucleótidos ISF e ISON. Tras esta segunda ronda de amplificación ningún producto PCR se visualizó en el gel de agarosa (resultados no mostrados). Llegados a este punto, se decidió verificar, a través de distintas pruebas si se trataba de una estirpe perteneciente al género *Salmonella*. La primera prueba fue antigénica (BioSign, PBM, Figura 5) y dio resultado positivo, la segunda bioquímica (Api, Biomerieux, Figura 6) y también fue positiva. Por tanto se asumió que la PCR dio un falso negativo. Este hecho no ocurrió con otras estirpes de la misma serovariedad (números 10, 13, 15, 37 y 46).

Figura 5. Prueba inmunológica con *S. montevideo* 6. La ventana marcada como S es el lugar dónde se coloca la muestra. Las marcas obtenidas (flechas) en las ventanas C y R indican que la muestra corresponde a una estirpe de *Salmonella*.

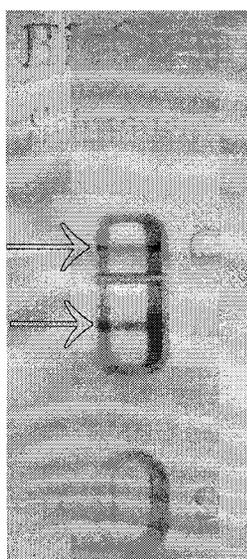


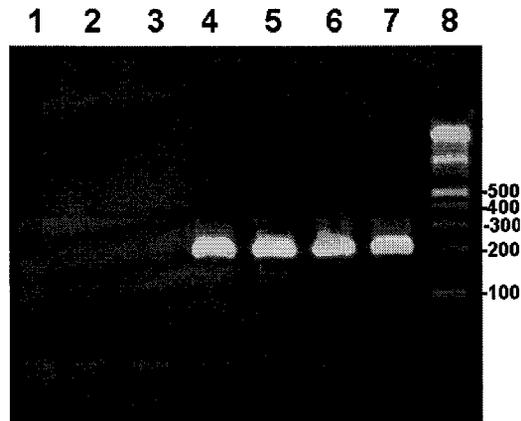
Tabla 8. Características bioquímicas de la *S. montevideo* 6.

CARACTERÍSTICA	RESULTADO
actividades enzimáticas	
β-galactosidasa	negativo
arginina dehidrolasa	negativo
lisina descarboxilasa	positivo
ornitina descarboxilasa	positivo
citocromo oxidasa	negativo
catalasa	positivo
gelatinasa	negativo
ureasa	negativo
triptófano desaminasa	negativo
fermentación/oxidación de azúcares	
glucosa	positivo
manitol	positivo
inositol	positivo
sorbitol	positivo
ramnosa	positivo
sacarosa	negativo
melibiosa	positivo
amigdalina	negativo
arabinosa	positivo
producción de	
indol	negativo
acetoina	negativo
NO ₂	positivo
SH ₂	positivo

En conclusión, mediante la PCR se detectaron 21 estirpes de *Salmonella* (de un total de 22). Esto significa que el método tuvo una sensibilidad relativa, definida como el porcentaje de positivos frente al total, del 95,5%.

Los cebadores diseñados para *Shigella* (VIRAF, VIRAR) se ensayaron mediante PCR utilizando 100 ng de ADN genómico aislado de *S. dysenteriae* 584. Los ensayos se hicieron inicialmente a diferentes temperaturas de hibridación (50, 55, 60 y 65°C). Una alícuota, de 5 µL, de estas reacciones se cargó en el gel de agarosa, observándose en todos los casos un producto de amplificación de unas 200 pb (resultado positivo). A continuación, se realizaron diferentes reacciones de PCR tomando la temperatura de hibridación más restrictiva (65°C) y variando la concentración de MgCl₂, observándose en gel de agarosa producto de amplificación entre 1-2,5 mM de MgCl₂ (Figura 6).

Figura 6. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la amplificación de *virA*. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificación con 100 ng de ADN de *S. dysenteriae* 584 y empleando diferentes concentraciones de $MgCl_2$. Las reacciones de amplificación se realizaron con los cebadores VIRAF/VIRAF y se cargaron 5 μ L en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. sin $MgCl_2$; 3. 0,5 mM $MgCl_2$; 4. 1 mM $MgCl_2$; 5. 1,5 mM $MgCl_2$; 6. 2 mM $MgCl_2$; 7. 2,5 mM $MgCl_2$; 8. marcador de 100 pb.



Las siguientes reacciones de amplificación se realizaron a 65°C de temperatura de hibridación y a 1,5 mM de $MgCl_2$, tal como quedó establecido en Material y Métodos. La PCR con 100 ng de ADN de otras estirpes de *Shigella* produjo productos de amplificación observables tras la electroforesis en gel de agarosa de 5 μ L de las reacciones de amplificación (Tabla 7). También fueron positivas las reacciones de PCR con los ADN de *E. coli* enteroinvasivas (*E. coli* O:124 y *E. coli* O:28, Tabla 7). Por tanto, la sensibilidad relativa para este método de PCR fue del 100%.

También se comprobó la efectividad del método PCR utilizando como molde ADN de células lisadas por calor, en lugar de ADN aislado. Los lisados celulares se prepararon suspendiendo una colonia de las distintas estirpes en 50 mL de agua, TE o agua de peptona y calentando durante 5 min en agua en ebullición. Se prepararon lisados celulares en agua, TE y agua de peptona de las diferentes estirpes de *Salmonella* y *Shigella*. Utilizando 2 μ L de los distintos lisados en la PCR con los cebadores específicos para cada una de estos grupos de bacterias, se observó siempre producto de amplificación tras cargar 5 μ L de las reacciones en gel de agarosa (Tabla 7). Como era de esperar, el método dio un resultado negativo con la estirpe *S. montevideo* 6.

Este resultado no se debió a que las células no se lisaran, puesto en esta estirpe sí se observó producto de amplificación en gel de agarosa tras la lisis y la reacción de PCR con los cebadores (16SF y 16SR) específicos para el ARNr 16S (Tabla 7).

Posteriormente se comprobó si el método podía simplificarse. La idea fue añadir directamente a la reacción de PCR los 2 μ L de inóculo de células, pensando que la lisis se haría en el transcurso del primer paso de la reacción (94°C durante 4 min). Nuevamente, el resultado fue positivo (e independiente del medio empleado para la suspensión de las células) tanto con las estirpes de *Salmonella* (excepto *Salmonella* 6), como con las estirpes de *Shigella*. Así, pudimos de una forma fácil y rápida ensayar el método PCR en otros tipos de bacterias. Este procedimiento recibió el nombre de “método de células enteras”, siendo el elegido para posteriores ensayos con células.

El problema del método de células enteras fue la interpretación de los resultados negativos, como es el de *Salmonella* 6. En estas situaciones, surgirá la duda de si la falta de amplificación era debida a la ausencia de las dianas para los cebadores (negativo real) o estaba motivada por la indisponibilidad del ADN molde, debido a que la lisis celular no era efectiva. Sin embargo, la interpretación de los resultados fue más fácil realizando dos reacciones de PCR en paralelo: una utilizando los cebadores que amplifican el ARNr 16S (cebadores universales de bacterias) y otra utilizando los cebadores específicos para la amplificación de IS200 o *virA*. En estos casos, se puede interpretar que la lisis celular fue efectiva siempre que se haya producido amplificación con los cebadores universales de bacterias. Estos cebadores no sólo son universales para las bacterias sino que además son específicos de los procariotas, lo cual se desprende de los resultados obtenidos en la PCR empleando ADN (100 ng) de diferentes levaduras (eucariotas) y cargando 25 μ L de las reacciones en un gel de agarosa (Tabla 7).

El método de las células enteras cuando se empleó agua de peptona como medio de suspensión de células funcionó tanto en *Salmonella* y *Shigella*. Dado que el agua de peptona se utilizó como medio de enriquecimiento de ambos tipos de bacteria, se decidió verificar si se podía obtener amplificación

con diferentes volúmenes de agua de peptona. Para ello se prepararon muestras de *S. typhimurium* 2 y *S. dysenteriae* 584 en 50 μ L de agua de peptona. Se tomaron alícuotas de cada muestra conteniendo 5, 10, 20 y 30 μ L y se ensayaron en PCR utilizando los cebadores específicos del uno y el otro tipo de bacterias. Tanto en *S. typhimurium* 2 (Figura 7) como en en *S. dysenteriae* 584 (Figura 8) se observaron productos de amplificación tras el gel de agarosa sólo en las alícuotas de 5 μ L de agua de peptona. Para comprobar si el efecto inhibitorio de la reacción de PCR se debió a un excesivo número de células o a la cantidad de agua de peptona empleada se decidió realizar amplificaciones con los diferentes volúmenes de agua de peptona (5, 10, 20 y 30 μ L) aunque esta vez conteniendo todos el mismo número de células. Para conseguir el mismo número de células, se tomaron inóculos con 5 μ L de agua de peptona y se les añadió agua de peptona sin inocular hasta alcanzar los volúmenes deseados. Para estos volúmenes (10, 20 y 30 μ L) no se obtuvo producto de amplificación ni en *S. typhimurium* 2 (con sus cebadores específicos) ni en *S. dysenteriae* 584 (con sus cebadores específicos), es decir que el agua de peptona fue el inhibidor de la PCR.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones con células de *S. typhimurium* 2 suspendidas en diferentes volúmenes de agua de peptona. La reacción de amplificación se realizó con los cebadores ISF/ISR y se cargó con 5 μ L en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. células en 5 μ L de agua de peptona; 3. células en 10 μ L de agua de peptona; 4. células en 20 μ L de agua de peptona; 5. células en 30 μ L de agua de peptona; 6. Marcador de 100 pb.

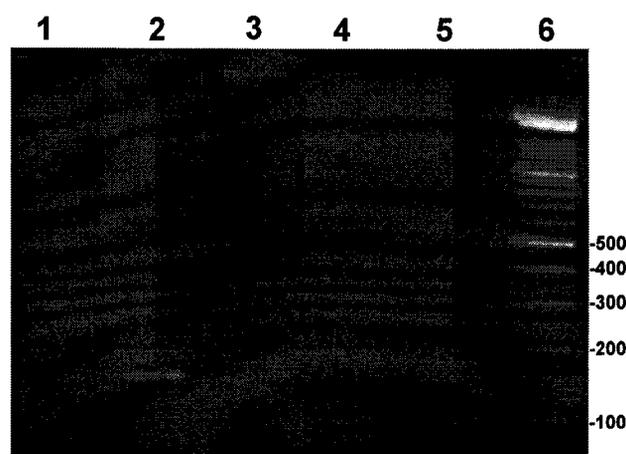
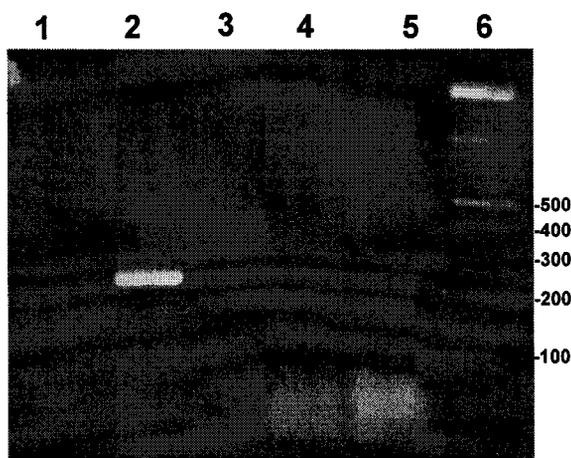


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones con células enteras de *S. dysenteriae* 584 suspendidas en diferentes volúmenes de agua de peptona. La reacción de amplificación se realizó con los cebadores VIRAF/VIRAR y se cargó con 5 μ L en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. células en 5 μ L de agua de peptona; 3. células en 10 μ L de agua de peptona; 4. células en 20 μ L de agua de peptona; 5. células en 30 μ L de agua de peptona; 6. marcador de 100 pb.



Una vez comprobado que los cebadores ISF e ISR daban resultados positivos en la mayoría de las estirpes de *Salmonella* y que los cebadores VIRAF y VIRAR daban resultados positivos con todas las estirpes de *Shigella*, se estudió su especificidad, es decir, si producían amplificación en otros microorganismos. Para determinar la especificidad se ensayó primero el método directo con los cebadores para amplificaciones específicas (IS200 y *virA*) y los cebadores para amplificaciones universales de bacterias. También se utilizó en las reacciones de amplificación el de ADN aislado (100 ng) de cada una de estos microorganismos. Los resultados obtenidos empleando células enteras y ADN aislado fueron idénticos. Tras cargar en un gel de agarosa 5 μ L de las diferentes reacciones de PCR, se comprobó que los cebadores específicos, ISF/ISR y VIRAF/VIRAR, no amplificaban en los microorganismos diferentes a *Salmonella* y *Shigella*/EIEC, respectivamente (Tabla 7). Para comprobar estos resultados, se repitieron las amplificaciones en las mismas condiciones y esta vez se emplearon en la electroforesis 25 μ L de las reacciones, pero el resultado fue el mismo.

Dado que los cebadores dieron resultados negativos en todas las estirpes de bacterias diferentes a *Salmonella* o *Shigella*, la especificidad relativa (tomada como el número de resultados negativos respecto del total) fue del 100% en ambos casos.

En los ensayos de PCR se había observado el tamaño de los productos de amplificación en gel de agarosa era el esperado, en todas las estirpes de *Salmonella* (un fragmento de 150 pb) o *Shigella* (un fragmento de 200 pb). Sin embargo, es posible obtener amplificadas con el mismo tamaño pero cuya secuencia no se corresponda con la secuencia que pretendíamos amplificar, esto es, IS200 o *virA*. Esta duda se resolvió secuenciando las amplificaciones obtenidas. Dado que hacerlo con todos y cada uno de los productos PCR era costoso y tedioso, se decidió simplificar y secuenciar el producto de amplificación de un representante de cada grupo: *S. typhimurium* 2 (Figura 9) y *S. dysenteriae* 584 (Figura 10).

Figura 9. Secuencia de nucleótidos del fragmento IS200 de *S. typhimurium* 2 amplificado por PCR. Las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación se muestran en negrita.

```

      10              30              50
      .              .              .
GCCGAAGATGAGTGTGTGTCGAGTTTCATGGGATATCTGAAGGGTAAAAGTAGTCTGATGCT
      70              90              110
      .              .              .
      TTACGAGCAGTTTGGGGATCTAAAATTCAAATACAGGAACAGGGAGTTCTGGTGCAGAGG
      130              150
      .              .
      GTACTATGTCGATACGGTGGGTAAGAACACGGCGAA
  
```

Figura 10. Secuencia de nucleótidos del fragmento *virA* de *S. dysenteriae* 584 amplificado por PCR. Las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación se muestran en negrita.

```

      10              30              50
      .              .              .
CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACATCACGTCTTCCTCTGTGGAACACATATATGCCCAA
      70              90              110
      .              .              .
      TTATGTCCGAAAACATAGAAAACAGGCTTAATTTTCATGCCTGAACAACGAGTTATTAACA
      130              150              170
      .              .              .
      ATTGTGGACATATTATAAAAATCAACGCAGTTGTCCCTAAAACGACACTGCAATCTCTG
      190              210
      .              .
      CCTCTGGGGGGAGGGCTTACGAAGTTAGCTCATCA
  
```

Para secuenciar los productos de PCR es necesario, en primer lugar, clonar los productos de amplificación en algún plásmido. Se eligió el plásmido pGEM-T, el cual se emplea específicamente para clonar los productos de PCR. El plásmido se caracteriza por tener una timidina (T) en sus extremos 3'. Estas timidinas emparejan fácilmente con su complementaria, la adenosina (A). Se ha demostrado (referencia) que la *Taq* ADN polimerasa tiene una actividad adenil transferasa 5' terminal, es decir, que los productos PCR van a tener una A protuyente en sus extremos 5'. Por tanto, en presencia de cualquier enzima ADN ligasa, la T del plásmido y la A del producto PCR pueden permitir la unión covalente (ligación) de ambos tipos de ADN.

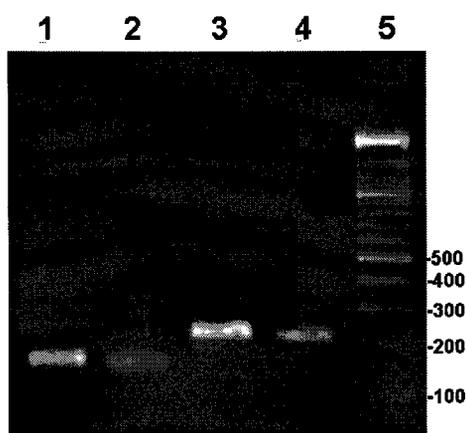
Los productos de amplificación de las estirpes antes mencionadas se clonaron en pGEM-T. Un representante de cada una de esas clonaciones se secuenció y comparó con las secuencias presentes en la bases de datos. El producto de amplificación de *S. typhimurium* 2 fue 100% idéntico a la región correspondiente de la secuencia IS200 de *S. typhimurium* (nº acceso L25848), mientras que el producto de amplificación de *S. dysenteriae* 584 fue idéntico a la región correspondiente de la secuencia *virA* de *S. flexneri* (nº acceso D26468), la única disponible en la base de datos.

Para averiguar si las amplificaciones en las otras estirpes de *Salmonella* y *Shigella* eran específicas, se utilizó la hibridación con sondas específicas para IS200 y *virA*. Se emplearon dos métodos diferentes de hibridación: en membrana (con sondas marcadas con Dig) y en pocillo (con sondas marcadas con biotina)

Las sondas empleadas (IS200 y VIRA) para la hibridación en membrana derivaron de los fragmentos IS200 o *virA*, que previamente habíamos clonado en un plásmido y cuyas secuencias habíamos establecido. Se empleó un marcaje de tipo no radioactivo (marcaje con Dig) debido a que las condiciones de trabajo con radioisótopos son exigentes e imposibles de trasladar a las industrias alimentarias, por el peligro de contaminación de los alimentos. El marcaje tradicional con la enzima Klenow se sustituyó por el marcaje por PCR con *Taq* ADN polimerasa, que produce una mayor cantidad de sonda marcada. Además, la eficiencia del marcaje con PCR es más fácil de averiguar, puesto

que tan sólo es necesario correr un gel de agarosa y cuantificar la cantidad de ADN cargado. La cuantificación fue posible porque la Dig que se incorporó en el proceso de síntesis hizo que los productos marcados fueran de mayor tamaño que los productos sin marcar (Figura 11).

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de diferentes amplificaciones con y sin digoxigenina. Se cargaron 5 μ L de las reacciones en los pocillos del gel. Carriles: 1. amplificación con digoxigenina del fragmento IS200; 2. amplificación sin digoxigenina del fragmento IS200; 3. amplificación con digoxigenina del fragmento *virA*; 4. amplificación sin digoxigenina del fragmento *virA*; 5. marcador de 100 pb.



Para determinar si las amplificaciones con los cebadores ISF/ISR produjeron ADN de IS200 y las amplificaciones con los cebadores VIRAF/VIRAR produjeron ADN de *virA*, bastó con colocar 2 μ L de las reacciones de PCR en una membrana de nylon e hibridar con las sondas IS200 y VIRA, respectivamente. Todas las estripes seleccionadas de *Salmonella* y de *Shigella* produjeron señal de hibridación (Tabla 9). Por el contrario, cuando la reacción de PCR se llevó a cabo con un ADN no homólogo (bacterias que no pertenecen ni al género *Salmonella* ni al género *Shigella*), no se obtuvo señal de hibridación con ninguna de las dos sondas (Tabla 9).

Tabla 9. Resultado de las amplificaciones con los cebadores ISF/ISR, VIRAF/VIRAR empleando diferentes microorganismos. Los productos de amplificación se detectaron mediante hibridación en membrana ("dot-blotting").

ESTIRPE	ISF/ISR	VIRAF/VIRAR
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-
<i>Arthrobacter oxydans</i>	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
Escherichia		
<i>E. coli</i> DH5 α	-	-
<i>E. coli</i> HB101	-	-
<i>E. coli</i> XL1-Blue	-	-
<i>E. coli</i> O:1	-	-
<i>E. coli</i> O:124, n $^{\circ}$ 121	-	+
<i>E. coli</i> O:28, n $^{\circ}$ 41	-	+
<i>E. coli</i> O:127	-	-
<i>E. coli</i> O:111	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	-	-
<i>Lactobacillus sake</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i>	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
Salmonella		
<i>S. abony</i>	+	-
<i>S. agona</i>	+	-
<i>S. blockey</i> , n $^{\circ}$ 11	+	-
<i>S. braenderup</i>	+	-
<i>S. bredeney</i>	+	-
<i>S. daressalaam</i>	+	-
<i>S. dublin</i> , n $^{\circ}$ 1	+	-
<i>S. enteritidis</i> , n $^{\circ}$ 14	+	-
<i>S. infantis</i>	+	-
<i>S. minnesota</i>	+	-
<i>S. montevideo</i> , n $^{\circ}$ 10	+	-
<i>S. panama</i> , n $^{\circ}$ 20	+	-
<i>S. paratyphi</i> A	+	-
<i>S. paratyphi</i> B	+	-
<i>S. paratyphi</i> C	+	-
<i>S. typhimurium</i> , n $^{\circ}$ 2	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-
Shigella		
<i>S. boydii</i> , n $^{\circ}$ 583	-	+
<i>S. dysenteriae</i> , n $^{\circ}$ 584	-	+
<i>S. flexneri</i> , n $^{\circ}$ 585	-	+
<i>S. sonnei</i> , n $^{\circ}$ 542	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-
<i>Yersinia pestis</i>	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-

*Hibridación.

- No hibridación.

Debido a que la técnica de hibridación es bastante laboriosa se decidió emplear también los cortos oligonucleótidos ISON y VSON como sondas internas para detectar IS200 y *virA*, respectivamente. Estos oligonucleótidos se marcaron con biotina y se emplearon para la hibridación en pocillo (EIA). Con este método se obtuvieron los mismos resultados que con la hibridación, pero expresados de una forma diferente. Tal como muestra la Figura 12, los valores mínimos obtenidos en *Salmonella* fueron, al menos, dos veces superior los valores máximos obtenido cuando en las amplificaciones sin ADN o con ADN no homólogos. De la misma manera, la Figura 13 muestra que los valores mínimos obtenidos en *Shigella* fueron, al menos, dos veces superior a los valores mínimos de las amplificaciones sin ADN o con ADN no homólogos.

Figura 12. Especificidad de la PCR con los cebadores ISF/ISR y empleando 100 ng de ADN de diferentes microorganismos, tras la hibridación en pocillo. Los valores del eje de ordenadas representan el cociente entre las absorbancias a 405 y 492 nm.

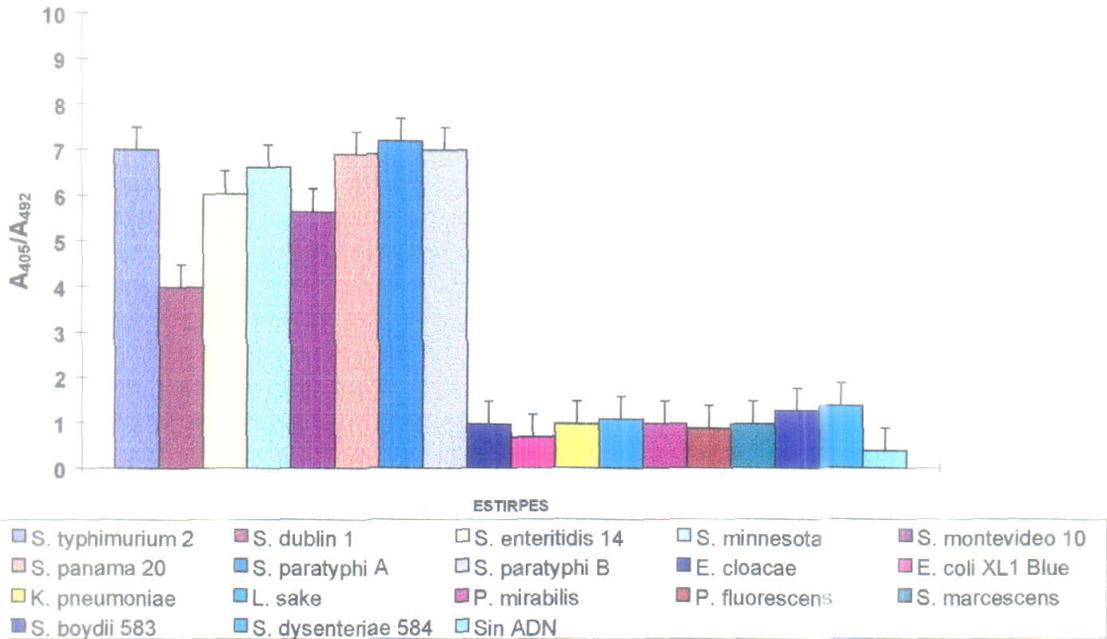
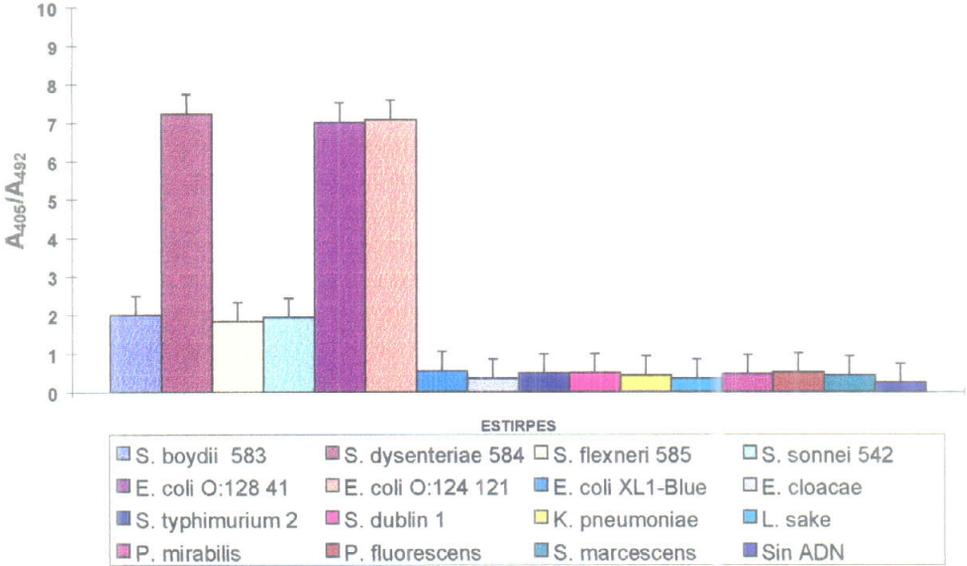


Figura 13. Especificidad de la PCR con los cebadores VIRAF/VIRAR y empleando 100 ng de ADN de diferentes microorganismos, tras la hibridación en pocillo. Los valores del eje de ordenadas representan el cociente entre las absorbancias a 405 y 492 nm.



3.4. Nivel de detección de la PCR con los cebadores que amplifican IS200 o *virA*.

Para averiguar el nivel mínimo de detección de la PCR cuando se emplea ADN asilado o células, se utilizaron *S. typhimurium 2* y *S. dysenteriae 584*.

El nivel mínimo de detección de ADN de la PCR (definido como la cantidad mínima de ADN requerido para detectar la amplificación) empleando la electroforesis en gel de agarosa y ADN de *Salmonella* fue de 50 fg (Figura 14A). También se determinó este valor utilizando la hibridación en membrana con la sonda IS200. El primer tipo de hibridación en membrana que se empleó fue el “southern blotting” y así se verificó que la señal de hibridación se produjo por un único producto de amplificación que tenía el tamaño esperado para el fragmento IS200 (Figura 14B). Para los ensayos sucesivos se utilizó el “dot blotting”, menos tedioso y más rápido de realizar. Mediante hibridación la detección fue más sensible que con la electroforesis, puesto que con 25 fg de ADN aislado se detectó amplificación por hibridación. Por último se empleó la hibridación en pocillo (EIA), obteniéndose el mismo nivel de sensibilidad que con la hibridación en membrana, 25 fg (Figura 14C). En ningún caso se obtuvo

un resultado positivo cuando en la reacción de PCR se emplearon 0,5, 1 o 10 fg de ADN de *S. typhimurium* 2 (Figura 14).

Figura 14. Nivel de detección de la PCR con los cebadores ISF/ISR y empleando ADN. (A) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando diferentes cantidades de ADN de *S. typhimurium* 2. Se cargó 25 μ L de las reacciones en los pocillos del gel. (B) Hibridación empleando el mismo gel y la sonda IS200. Carriles: 1. control sin ADN; 2. 0,5 fg ADN de *Salmonella*; 3. 1 fg ADN *Salmonella*; 4. 10 fg ADN *Salmonella*; 5. 25 fg ADN *Salmonella*; 6. 50 fg ADN *Salmonella*; 7. 100 fg ADN *Salmonella*; 8. marcador 100 pb.

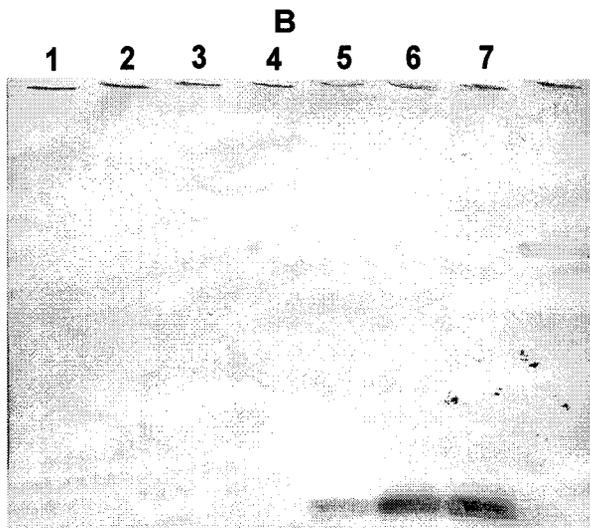
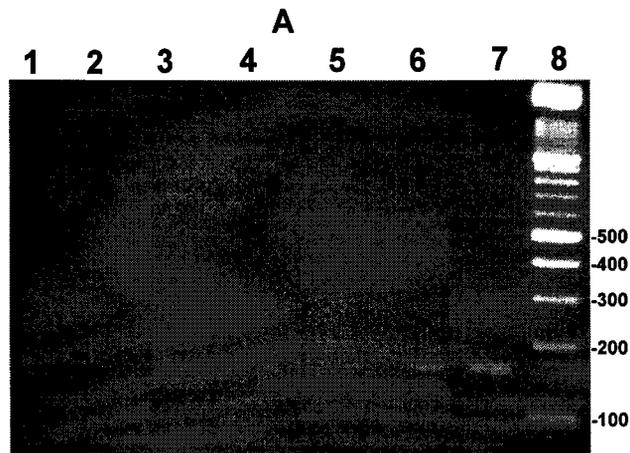
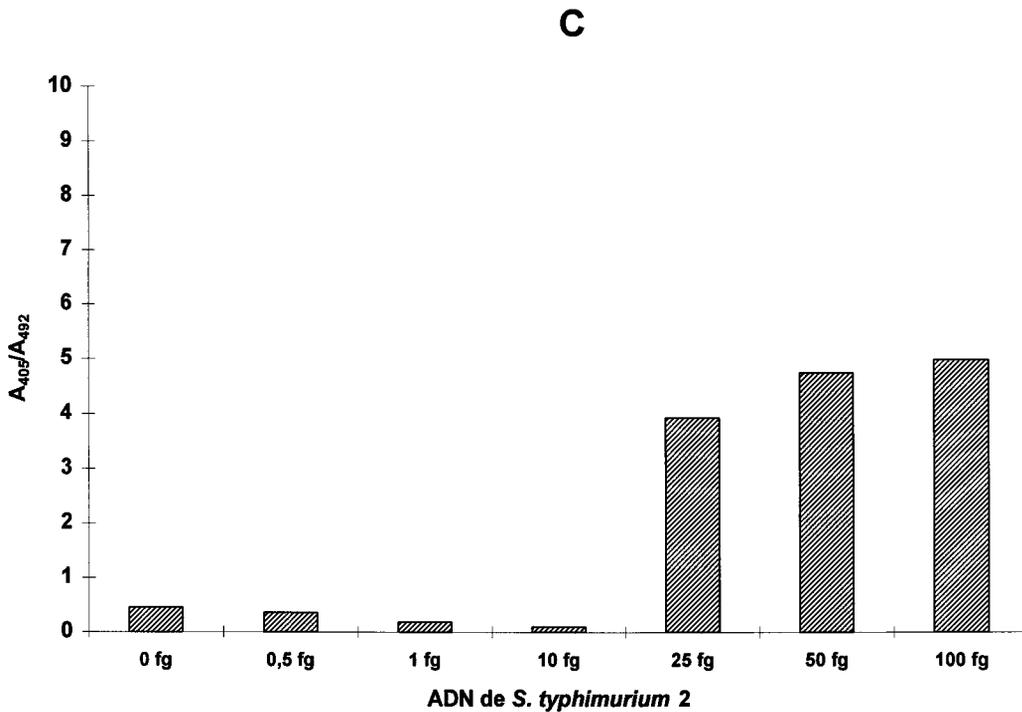


Figura 14 (continuación). (C) Hibridación en pocillo empleando el oligonucleótido ISON y 25 μ L de distintas amplificaciones realizadas con diferentes cantidades de ADN de *S. typhimurium* 2.



El nivel mínimo de detección de ADN de la PCR empleando la electroforesis en gel de agarosa y ADN de *Shigella* fue de 25 fg (Figura 15B). De la misma forma que en *Salmonella*, se determinó también este valor utilizando la hibridación con la sonda VIRA por “southern blotting” (Figura 15B) y por “dot blotting”. El nivel de sensibilidad alcanzado con la hibridación se situó en 1 fg de ADN. El nivel mínimo de detección mediante el EIA fue de 10 fg (Figura 15C), es decir, este método fue menos sensible que la hibridación en membrana. En ningún caso las reacciones con 0 ó 5 fg de ADN produjeron un resultado positivo (Figura 15).

Figura 15. Nivel de detección de la PCR con los cebadores VIRAF/VIRAR y empleando ADN. (A) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando diferentes cantidades de ADN de *S.dysenteriae* 584. Se cargó 25 μ L de las reacciones en los pocillos del gel. (B) Hibridación empleando el mismo gel y la sonda VIRA. Carriles: 1. Control sin ADN; 2. 1 fg ADN de *Shigella*; 3. 10 fg ADN *Shigella*; 4. 25 fg ADN *Shigella*; 5. 50 fg ADN *Shigella*; 6. 100 fg ADN *Shigella*; 7. marcador 100 pb.

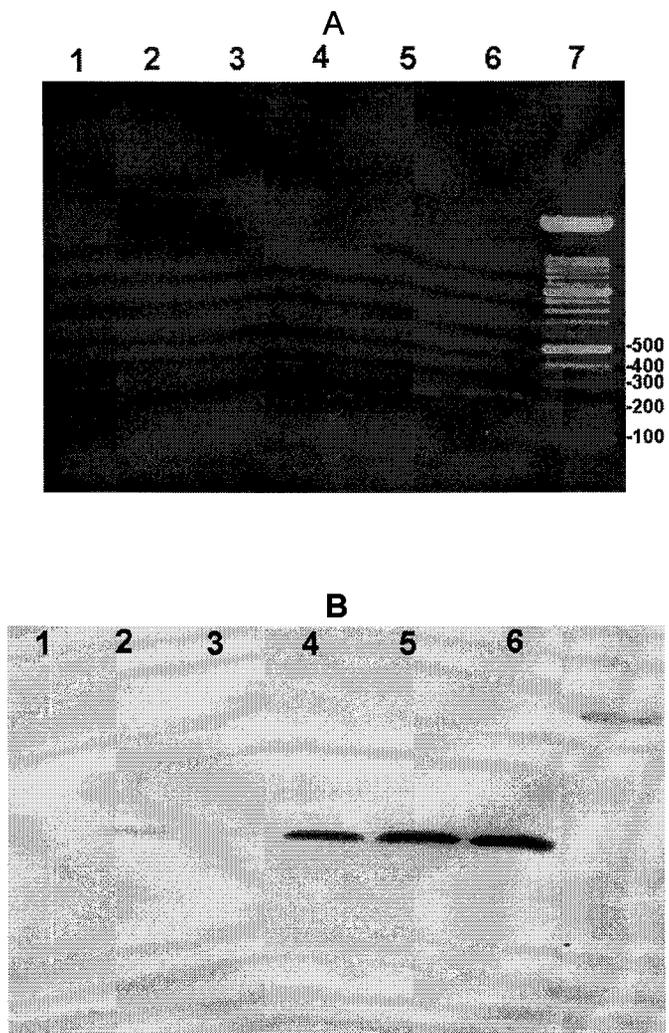
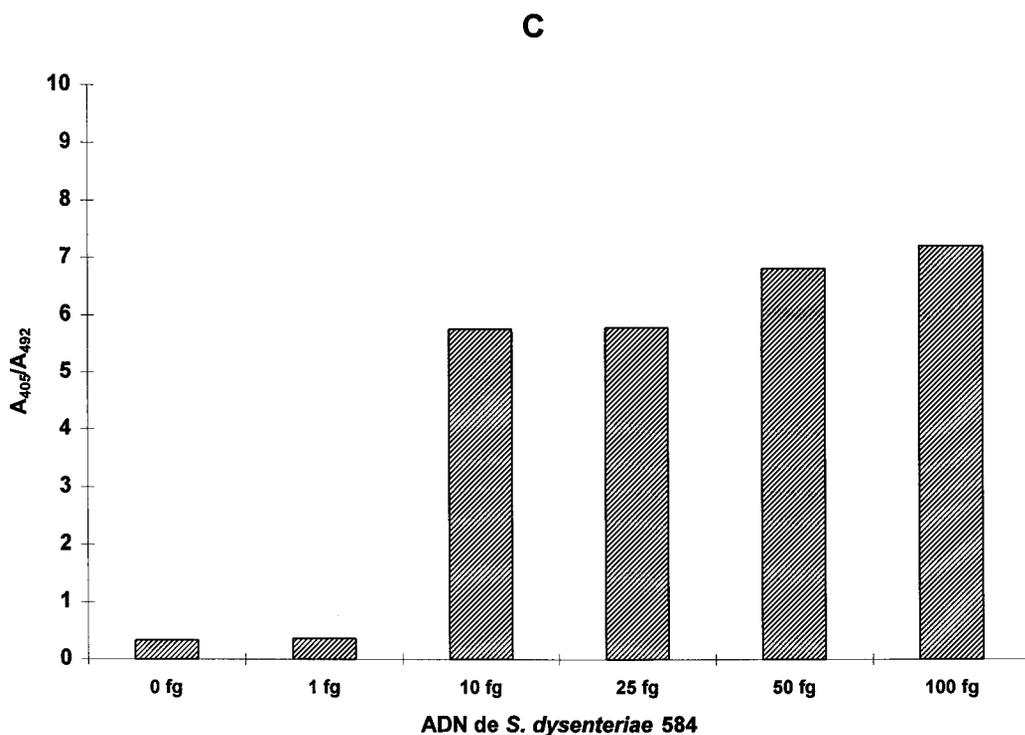


Figura 15 (continuación). (C) Hibridación en pocillo empleando el oligonucleótido VSON y 25 μ L de distintas amplificaciones realizadas con diferentes cantidades de ADN de *S. dysenteriae* 584.



El porcentaje de positivos empleando en la PCR 10 fg de ADN de *S. typhimurium* 2 y utilizando el “dot blotting” para detectar las amplificaciones fue 22%. De la misma forma, con 1 fg de ADN de *S. dysenteriae* 584 en la reacción de PCR y utilizando el “dot blotting” para detectar las amplificaciones, se obtuvieron un 30% de positivos.

Por otra parte también se averiguó el nivel mínimo de detección de la PCR utilizando células (definido como la cantidad mínima de células requeridas para detectar la amplificación). En este caso la detección de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. No fue necesario utilizar ningún otro método de detección de ADN (hibridación: “southern- dot-blotting” o EIA) puesto que con la electroforesis se alcanzó un nivel de detección suficiente.

El nivel mínimo de detección de células mediante la PCR y usando la electroforesis en gel de agarosa, se estimó en el caso de *S. typhimurium* 2 en menos de 10 unidades formadoras de colonias (cfu). La estimación se realizó a partir de los resultados obtenidos en las amplificaciones con 5 μ L de varias

diluciones secuenciales (de factores de 10) de un inóculo en agua de peptona conteniendo $37,5 \pm 3 \times 10^6$ células de *Salmonella* por cada 5 μ L. Como se muestra en la Figura 16, la PCR fue negativa cuando la dilución llegó al factor de extinción (0 células), y positiva cuando se utilizó la muestra sin diluir, es decir, la presencia de un número alto de células no fue inhibitoria. Por tanto, y en la situación menos favorable seríamos capaces de detectar 10 células en 5 μ L de agua de peptona, es decir, 2000 cél/mL.

Así mismo, el nivel de detección fue menor a 10 cfu en el caso de *S. dysenteriae* 584. La estimación se realizó, también, a partir de los resultados obtenidos de las amplificaciones con 5 μ L de diferentes diluciones secuenciales (de factores 10) de una muestra conteniendo $28,4 \pm 3,3 \times 10^6$ células por cada 5 μ L. Como se muestra en la Figura 17, la PCR fue negativa cuando la dilución llegó al factor de extinción (0 células), y positiva cuando se utilizó un gran número de células, por tanto tampoco tampoco se inhibió la reacción de PCR por un alto número de células. Al igual que en *Salmonella* el método en *Shigella* detecta 2000 cél/mL.

Figura 16. Nivel de detección de la PCR con los cebadores ISF/ISR y empleando células. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones con alícuotas de 5 μ L de distintas diluciones de un cultivo de *S. typhimurium* 2 a una concentración de $37,5 \times 10^6$ células en 5 μ L. Se cargó con 25 μ L de las reacciones de amplificación en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. dilución 10^{-9} ; 3. dilución 10^{-8} ; 4. dilución 10^{-7} ; 5. dilución 10^{-6} ; 6. dilución 10^{-5} ; 7. marcador de 100 pb.

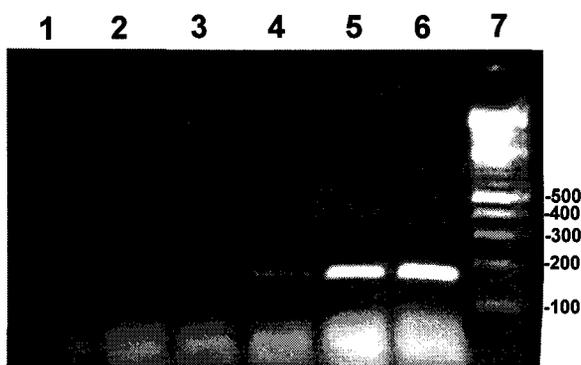
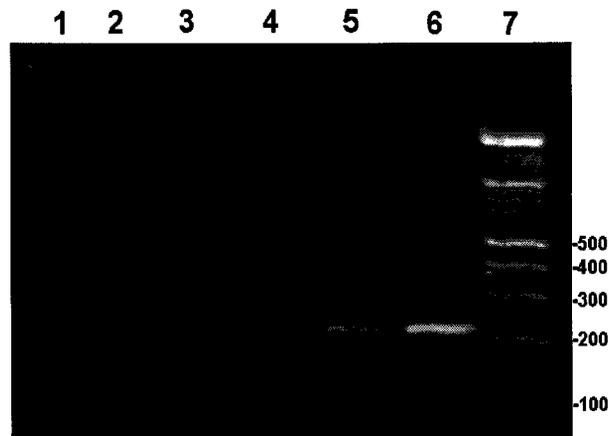


Figura 17. Nivel de detección de la PCR con los cebadores VIRAF/VIRAR y empleando células. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones con alícuotas de 25 μ L de distintas diluciones de un cultivo de *S. dysenteriae* 584 a una concentración de $28,4 \times 10^6$ células en 5 μ L. Se cargó con 25 μ L de las amplificaciones en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. dilución 10^{-9} ; 3. dilución 10^{-8} ; 4. dilución 10^{-7} ; 5. dilución 10^{-6} ; 6. dilución 10^{-5} ; 7. marcador de 100 pb.



3.5. Amplificación de IS200 y *virA* en presencia de ADN no homólogo.

Se quiso averiguar si manteniendo fijo el un número de dianas, la reacción de PCR se veía influenciada de alguna manera por la presencia de ADN heterólogo, es decir, sin dianas para los cebadores específicos de IS200 o *virA*. Para averiguarlo decidimos ensayar una cantidad fija de ADN molde amplificable, añadiendo una cantidad variable de ADN no amplificable. Se seleccionó *Serratia marcescens* como fuente de ADN heterólogo, ya que ni su ADN ni sus células produjeron amplificación cuando se emplearon los cebadores ISF/ISR o VIRAF/VIRAR (Tabla 7 y Tabla 8). Además, el color rojo que adoptan las colonias en los cultivos viejos nos serviría para distinguir *Serratia* de *Salmonella* y *Shigella* en el recuento en placa. Como fuente de ADN homólogo, amplificable, se seleccionaron las estirpes *S. typhimurium* 2 o *S. dysenteriae* 584, para utilizarlas con sus respectivos cebadores.

4. DISCUSIÓN

Los ensayos de PCR empleando 100 ng de ADN aislado de *Salmonella* y diferentes cantidades (desde 100 hasta 2000 ng) de ADN aislado de *Serratia*, mostraron que los productos de amplificación eran claramente visibles en gel de agarosa (Figura 18A), aún en cuando en la reacción de PCR se hubiese añadido una gran cantidad (2 µg) de ADN de *Serratia*. De la misma manera, los ensayos de PCR en muestras conteniendo células de *Salmonella* y *Serratia* produjeron productos de amplificación visibles en geles de agarosa, incluso cuando el número de células de *Serratia* fue unas 10^3 veces superior al de *Salmonella* (3500 y 3 células, respectivamente) (Figura 18B).

Figura 18. Amplificación del fragmento de la secuencia de inserción IS200 en presencia de ADN no homólogo. (A) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando 100 ng de ADN de *S. typhimurium* 2 y diferentes cantidades de ADN de *S. marcescens*. Las reacciones de PCR se realizaron con los cebadores ISF/ISR y se cargó con 25 µL en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. 100 ng ADN *Serratia* y sin ADN de *Salmonella*; 3. 100 ng ADN de *Serratia*; 4. 200 ng ADN de *Serratia*; 5. 500 ng ADN de *Serratia*; 6. 1 µg ADN de *Serratia*; 7. 2 µg ADN de *Serratia*; 8. ADN de *Salmonella*. 9. marcador de 100 pb.

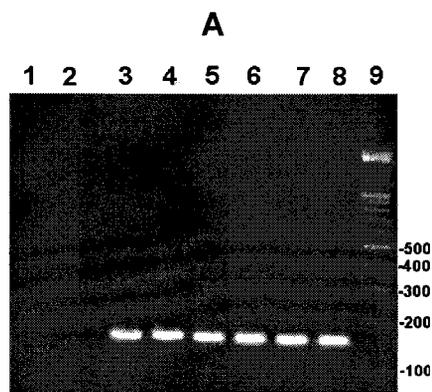
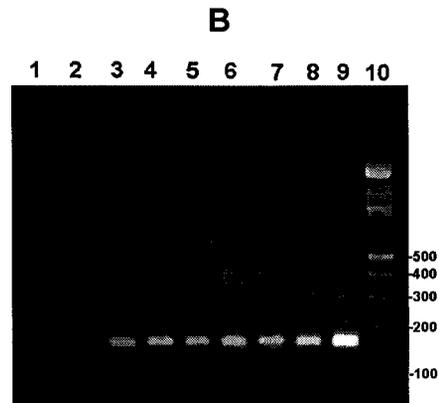
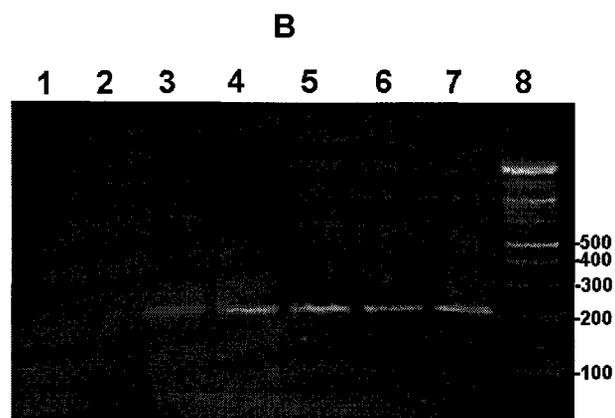
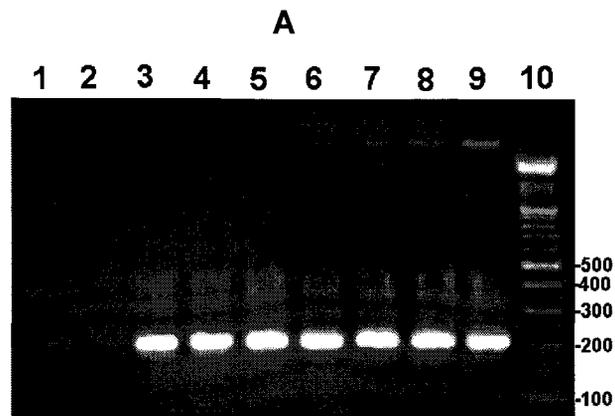


Figura 18 (continuación). (B) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando diferente número de células de *Salmonella* y *Serratia*. Las reacciones de PCR se realizaron con los cebadores ISF/ISR y se cargó con 25 μ L en los pocillos del gel. Carriles: **1.** control sin células; **2.** 350×10^7 células de *Serratia*; **3.** 3 células de *Salmonella* y 35000 de *Serratia*; **4.** 3 células de *Salmonella* y 350 de *Serratia*; **5.** 3 células de *Salmonella* y 35 de *Serratia*; **6.** 30 células de *Salmonella* y 35000 de *Serratia*; **7.** 30 células de *Salmonella* y 3500 de *Serratia*; **8.** 30 células de *Salmonella* y 350 de *Serratia*; **9.** 32×10^6 *Salmonella*; **10.** marcador de 100 pb.



El comportamiento fue similar en las amplificaciones con *Shigella* y *Serratia*, lógicamente con sus cebadores específicos. Todas las amplificaciones dieron resultado positivo cuando se empleó 100 ng de ADN aislado de *S. dysenteriae* 584 y diferentes cantidades de ADN (desde 100 a 2000 ng) aislado de *S. marcescens* (Figura 19A). Como era de esperar, los ensayos con muestras conteniendo células de ambos tipos de bacterias dieron positivo, aunque el número de células de *Serratia* fuera unas 10^3 veces superior al de *Shigella* (22000 y 18 células, respectivamente. Figura 19B).

Figura 19. Amplificación del fragmento del gen *virA* en presencia de ADN no homólogo. (A) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando 100 ng de ADN de *S. dysenteriae* 584 y diferentes cantidades de ADN de *S. marcescens*. Las reacciones de PCR se realizaron con los cebadores VIRAF/VIRAR y se cargó con 25 μ L en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin ADN; 2. 100 ng ADN *Serratia* y sin ADN de *Shigella*; 3. 100 ng ADN de *Serratia* ; 4. 200 ng ADN de *Serratia*; 5. 300 ng ADN de *Serratia*; 6. 500 ng ADN de *Serratia*; 7. 1 μ g ADN de *Serratia*; 8. 2 μ g ADN de *Serratia*; 9. ADN de *Shigella*; 10. marcador de 100 pb. (B) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando diferente número de células de *Shigella* y *Serratia*. Las reacciones de PCR se realizaron con los cebadores VIRAF/VIRAR y se cargó con 25 μ L en los pocillos del gel. Carriles: 1. control sin células; 2. 22×10^3 células de *Serratia*; 3. 18 células de *Shigella* y 22 de *Serratia*; 4. 18 células de *Shigella* y 220 de *Serratia*; 5. 18 células de *Shigella* y 2200 de *Serratia*; 6. 18 células de *Shigella* y 22×10^3 de *Serratia*; 7. 18 células de *Shigella*; 8. marcador de 100 pb.



3.6. Amplificación múltiple IS200/*virA*.

La PCR múltiple es una amplificación en la que se utilizan dos o más parejas de cebadores, siendo cada pareja específica para un tipo de secuencia. Puesto que disponíamos dos parejas de cebadores (ISF/ISR y VIRAF/VIRAR) cada una específica para un tipo de secuencia, más aún, cada una específica para un tipo de bacterias, se efectuaron ensayos de PCR múltiple para detectar ambos tipos de secuencias a la vez. En los ensayos se tomaron como representantes de sus respectivos grupos a *S. typhimurium* 2 y *S. dysenteriae* 584.

En el primer ensayo se emplearon con 100 ng de ADN de *S. typhimurium* 2 y 100 ng de ADN de *S. dysenteriae* 584. Puesto que previamente se había comprobado que las amplificaciones simples funcionaban bien a 65°C y a 1,5 mM de MgCl₂ (Figura 4, página xx y Figura 6, página xx), se emplearon estas condiciones también para la PCR múltiple. La amplificación múltiple fue positiva ya que tras la PCR se pudo observar en gel de agarosa un fragmento de ADN de 150 pb (IS200) y otro de unos 200 pb (*virA*) (Figura 20A).

Una vez comprobada la eficacia, se procedió a amplificar con células de *S. typhimurium* 2 y *S. dysenteriae* 584. Estos experimentos también dieron resultados positivos en gel de agarosa (Figura 20B). Con estos ensayos, además se pudo determinar el nivel de detección (menos de 10 cfu de *Salmonella* y/o *Shigella*) de la PCR múltiple.

Determinado el nivel de sensibilidad con las células, se analizó el nivel mínimo de detección empleando en la PCR ADN aislado. Los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los obtenidos en las amplificaciones simples; incluso utilizando en la PCR 25 fg de ADN de *S. typhimurium* 2 y 25 fg de ADN de *S. dysenteriae* 584, se visualizaron en gel de agarosa ambos productos de amplificación (Figura 21A). Cuando se empleó el "southern-blotting", hibridando a la vez con las sondas IS200 y VIRA, se pudo detectar la presencia de 10 fg de ADN de *Salmonella* y *Shigella* en la reacción de PCR (Figura 21B).

Figura 20. Amplificación múltiple de IS200 y *virA*. (A) Electroforesis en gel de agarosa de distintas amplificaciones dobles empleando 100 ng de ADN de *S. typhimurium* 2 y/o 100 ng de ADN de *S. dysenteriae* 584. (B) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones dobles empleando células enteras de *S. typhimurium* 2 y de *S. dysenteriae* 584. En los pocillos del gel de agarosa se cargaron 5 μ L de las reacciones de PCR. Carriles: 1. control sin ADN; 2. *Shigella* (aproximadamente 4 células) con los cebadores ISF/ISR+VIRAF/VIRAR; 3. *Salmonella* (aproximadamente 6 células) con ISF/ISR+VIRAF/VIRAR; 4. *Salmonella+Shigella* (aproximadamente 62 y 4 células, respectivamente) con los cebadores ISF/ISR+VIRAF/VIRAR; 5. *Salmonella+Shigella* (aproximadamente 6 y 43, respectivamente) ISF/ISR+VIRAF/VIRAR; 6. marcador de 100 pb.

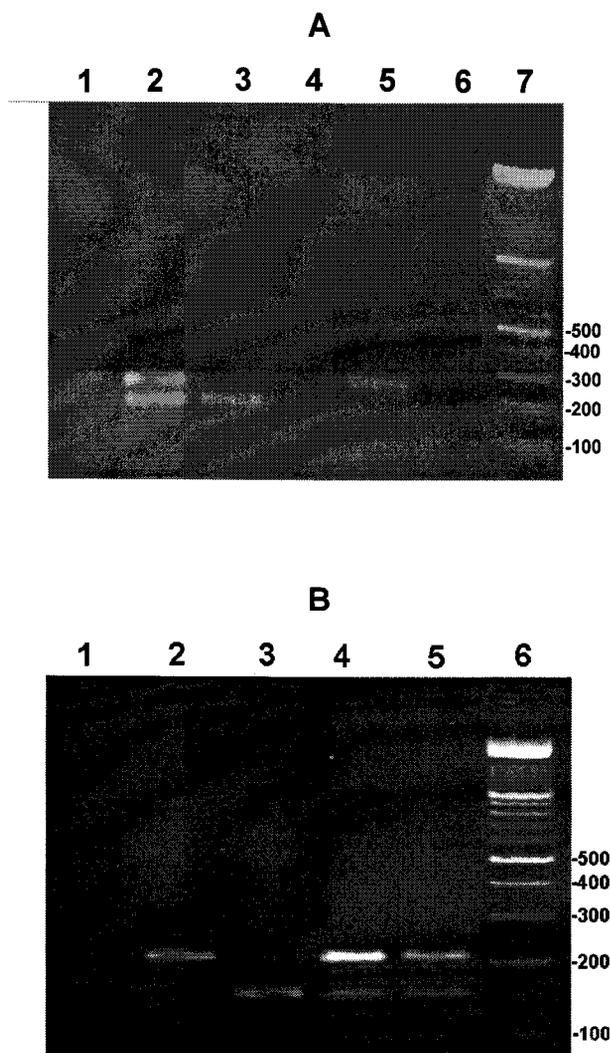
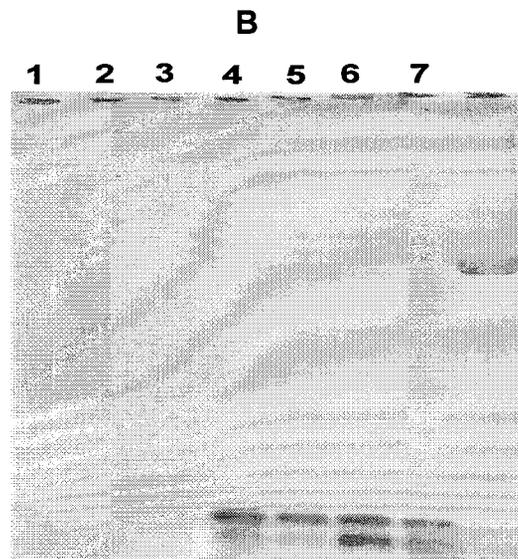
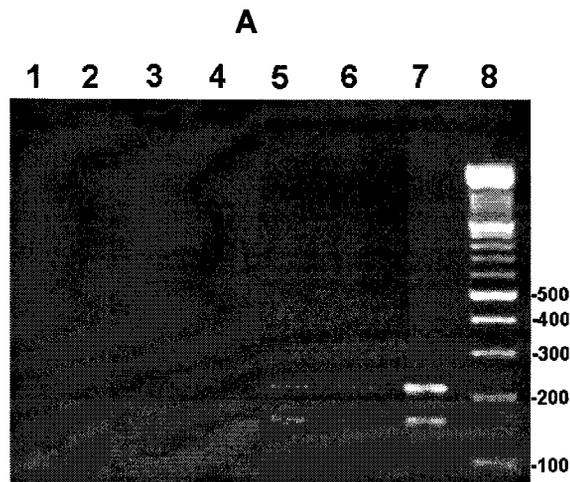


Figura 21. Nivel de detección de la PCR múltiple. (A) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones empleando diferentes cantidades de ADN de *S. typhimurium* 2 y *S. dysenteriae* 584 y las parejas de cebadores ISF/ISR y VIRAF/VIRAR. (B) Hibridación empleando el mismo gel y las sondas IS200 y VIRA a la vez. Los pocillos del gel de agarosa se cargaron con 25 μ L. Carriles: **1.** control sin ADN; **2.** 0,5 fg de ADN de *Salmonella* y 0,5 fg de ADN de *Shigella*; **3.** 1 fg de ADN de *Salmonella* y 1 fg de ADN de *Shigella*; **4.** 10 fg de ADN de *Salmonella* y 10 fg de ADN de *Shigella*; **5.** 25 fg de ADN de *Salmonella* y 25 fg de ADN de *Shigella*; **6.** 50 fg de ADN de *Salmonella* y 50 fg de ADN de *Shigella*; **7.** 100 fg de ADN de *Salmonella* y 100 fg de ADN de *Shigella*; **8.** marcador 100 pb.

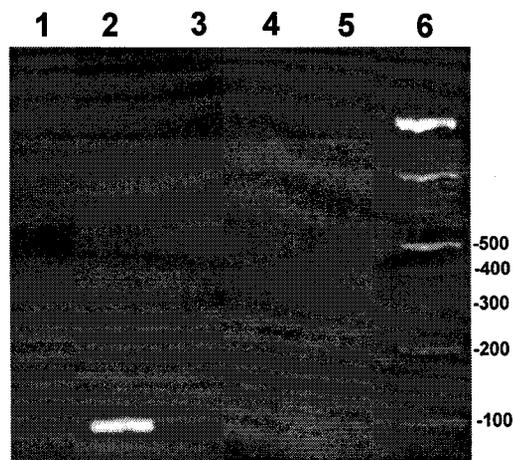


3.7. Detección por PCR de *Salmonella* y *Shigella* en mayonesa.

En las secciones anteriores se ha comprobado que el método de PCR que hemos diseñado es un sistema sensible y específico para detectar la presencia de células de *Salmonella* o *Shigella*. Para averiguar si el método podía aplicarse para detectar estas bacterias en las mayonesas, se decidió inocular la mayonesa con *Salmonella* y *Shigella*. Nuevamente se eligieron la estirpe *S. typhimurium* 2 y *S. dysenteriae* 584.

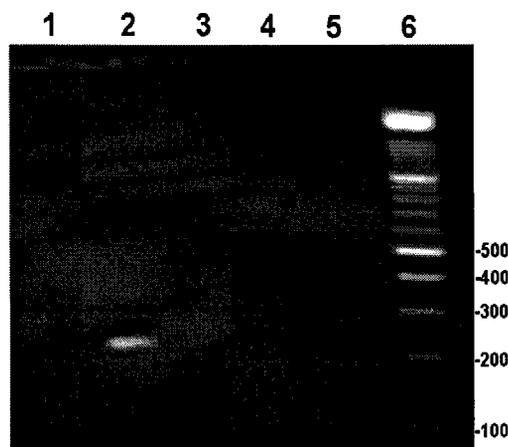
Inicialmente se determinó el volumen máximo de muestra de mayonesa inoculada con *Salmonella* o *Shigella* que se podía emplear en las amplificaciones. Para ello, se preparó una muestra de mayonesa diluida 1/10 en agua de peptona inoculando con $29 \pm 2 \times 10^2$ cél/mL de *Salmonella* y se amplificaron alícuotas de 5, 10, 20, 30 μ L para la PCR. Tras la electroforesis en gel de agarosa, tan sólo se observó producto de amplificación con la alícuota de 5 μ L de mayonesa diluida e inoculada (Figura 22).

Figura 22. Detección de *Salmonella* en mayonesa. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones con diferentes volúmenes de una preparación de mayonesa diluida (1/10) en agua de peptona e inoculada con *S. typhimurim* 2. La reacción de PCR se realizó con los cebadores ISF/ISR y se cargó 5 μ L en el gel de agarosa. Carriles: 2., 3., 4. y 5., amplificaciones utilizando respectivamente 5, 10, 20, y 30 μ L de mayonesa diluida en agua de peptona; 1. control sin inocular; 6. marcador de 100 pb



De la misma manera, se preparó una muestra de mayonesa diluida 1/10 en agua de peptona que se inoculó con $49\pm 5 \times 10^3$ cél/mL de *Shigella*, y se tomaron alícuotas de 5, 10, 20 y 30 μ L para la PCR. Igual que en el caso anterior, tan sólo se obtuvo amplificación con la alícuota de 5 μ L de mayonesa diluida e inoculada (Figura 23). Se decidió, a partir de entonces y en cualquier caso, ensayar en PCR alícuotas de 5 μ L de mayonesa diluida e inoculada bien con *Salmonella* o *Shigella*.

Figura 23. Detección de *Shigella* en mayonesa. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones con diferentes volúmenes de una preparación de mayonesa diluida (1/10) en agua de peptona e inoculada con *S. dysenteriae* 584. La reacción de PCR se realizó con los cebadores VIRAF/VIRAR y se cargó 5 μ L en el gel. Carriles: 2., 3., 4. y 5., amplificaciones utilizando respectivamente 5, 10, 20, y 30 μ L de mayonesa diluida en agua de peptona; 1. control sin inocular; 6. marcador de 100 pb



Se quiso también averiguar el nivel mínimo de detección de la PCR utilizando mayonesa diluida 10 veces en agua de peptona. Para ello, se preparó una muestra de mayonesa diluida inoculada con $29\pm 2 \times 10^1$ cél/mL de *Salmonella* (esto es, al menos 1 célula por cada 5 μ L) y otra muestra de mayonesa inoculada con $2,4\pm 1,9 \times 10^1$ cél/mL de *Shigella* (esto es al menos 1 células por cada 5 μ L). Los ensayos de PCR con 5 μ L de estas preparaciones de mayonesa diluida e inoculada (con *Salmonella* o *Shigella*) y con los cebadores específicos correspondientes (ISF/ISR o VIRAF/VIRAF), fueron

positivos en gel de agarosa cargando 25 μ L de las reacciones de amplificación (resultados no mostrados). Por tanto, se estimó que el nivel de detección fue menor a 10 cfu. Esto supone detectar 2000 células de *Salmonella* o *Shigella* en una muestra de mayonesa diluida.

3.8. Modelo para la detección por PCR de *Salmonella* o *Shigella* en mayonesa.

Como se estableció en la introducción, la legislación Española exige la ausencia de *Salmonella* y *Shigella* en 25 g de mayonesa, esto quiere decir que la presencia de tan sólo una de esas bacterias en 25 g de producto impediría la comercialización del producto. Dada la sensibilidad de los métodos antes descritos, se podría detectar una bacteria mediante PCR, pero obviamente no en 25 g de mayonesa. Por tanto, el método de detección por PCR de *Salmonella* y *Shigella* que se propone, implicaría un enriquecimiento previo de esas bacteria en agua de peptona. La metodología a seguir sería: tomar 25 g de mayonesa y diluir hasta 250 mL con agua de peptona homogenizar, y separar en muestras de 50 mL. Incubar cada muestra, tomar alícuotas de 5 μ L de cada una de las muestras de 50 mL y amplificar por PCR para detectar la presencia de *Salmonella* y/o *Shigella*. Para que este modelo funcione correctamente tenemos que conocer el tiempo que hay que preenriquecer para obtener una concentración de 2000 cél/mL (el nivel mínimo de detección de la PCR). Para conocer este tiempo, fue necesario inicialmente calcular el tiempo de generación de *Salmonella* y *Shigella*. Se decidió calcular, entonces, el tiempo de generación de *S. typhimurium* 2 y *S. dysenteriae* 584. El tiempo se calculó en la fase exponencial de crecimiento para cada una de esas estirpes, estimándose en 20 min para *Salmonella* y 33 min para *Shigella*. Así, se calculó que para obtener 2000 cél/mL de *Salmonella* en 50 mL de mayonesa diluida era necesario preenriquecer durante unos 330 minutos a partir de una única célula. Este tiempo fue de 550 minutos en el caso de *Shigella*.

Conocidos los tiempos de generación se hizo una preparación con 5 g de mayonesa diluida hasta 50 mL con agua de peptona, se inoculó con *S.*

typhimurium 2 ($12,3 \pm 2,4$ células en los 50 mL) y se incubó durante 8 horas a 37°C. Las alícuotas de 5 μ L de mayonesa diluida tomadas a las 6, 7 y 8 h dieron un resultado positivo en los ensayos de PCR tras cargar 5 μ L de la reacción en gel de agarosa (resultados no mostrados).

De la misma manera, una preparación con 5 g mayonesa diluida con agua de peptona hasta 50 mL se inoculó con células de *S. dysenteriae* ($13,2 \pm 3,1$ células en los 50 mL) y se incubó durante 8 h a 37°C. Las alícuotas de 5 μ L de mayonesa diluida tomadas a las 7 y 8 h dieron resultados positivos en los ensayos de PCR tras cargar 5 μ L de la reacción en gel de agarosa (resultados no mostrados).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki, *et al.*, 1985) es una poderosa e ingeniosa herramienta para amplificar ácidos nucleicos que ha revolucionado la Biología Molecular. Este método no es el único descrito para la amplificación de ácidos nucleicos (Van Brunt, 1990), y entre otros cabe citar el método de la Q β replicasa (Cahill, *et al.*, 1991) o la reacción en cadena de la ligasa (Birkenmeyer y Armstrong, 1992). Sin embargo la PCR es el método más empleado, debido en gran medida a la utilización de ADN polimerasas termoestables (Saiki, *et al.*, 1988) y por la posibilidad de automatización de la técnica.

La Microbiología, y dentro de ella la Microbiología Alimentaria, es una de las áreas que más se ha beneficiado del empleo de la PCR. El auge de esta técnica como herramienta en la Microbiología Alimentaria viene dado por la necesidad de métodos rápidos y fiables para el control microbiológico de los alimentos. Este control microbiológico es necesario porque ocurren numerosas enfermedades son provocadas por microorganismos, presentes en los alimentos. En muchos casos no se puede identificar el agente etiológico responsable de la enfermedad por los métodos tradicionales de detección e identificación de microorganismos en los alimentos porque el bajo número de esos microorganismos o bien las sustancias presentes en los alimentos dificultan su recuperación. Pero el mayor inconveniente de los métodos tradicionales es que son lentos y sólo se completan después de varios días, transcurridos los cuales es incluso difícil demostrar que el microorganismo rescatado es patógeno para el hombre.

La introducción del concepto HACCP (análisis de peligrosidad y control de puntos críticos) dio un nuevo sentido a la utilización de los métodos tradicionales, puesto que el control del producto terminado, aunque necesario por ley, no es tan importante como el control de cada una de las fases de la producción. No obstante, la PCR no es sólo una buena herramienta para el control del producto terminado sino que posiblemente es mejor método que los tradicionales para desarrollar el concepto HACCP.

Uno de los puntos importantes en la producción de alimentos, es que sean seguros y estables desde el punto de vista microbiológico. Para obtener

un alimento con estas características es necesario, normalmente, modificar sus condiciones físico-químicas para que no se produzca la proliferación de todos aquellos microorganismos no deseables. Con esta finalidad, lo más sencillo es añadir preservadores químicos, sin embargo, la aceptación por parte de los consumidores de tales sustancias es escasa, y las industrias han tenido que emplear formas más naturales para evitar la contaminación microbiana de los alimentos. Es esto, precisamente lo que Ybarra hace con su mayonesa (que es alimento objeto de este trabajo), conseguir un producto estable y seguro modificando dos parámetros: la actividad del agua y la acidez. Estas modificaciones justifican la escasa variabilidad de microorganismos que hemos aislado a partir de la mayonesa Ybarra. Además de las levaduras aisladas, tan sólo se han encontrado tres tipos diferentes de bacterias: *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Staphylococcus*.

La presencia de estas estripes en la mayonesa es sorprendente porque la actividad del agua y acidez de la mayonesa Ybarra no son adecuadas para su proliferación. Sin embargo, está descrito que algunas especies de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* se pueden encontrar en la mayonesa, no así las bacterias del género *Arthrobacter*. La presencia de las estripes de *Bacillus* se puede justificar por su capacidad de producir esporas resistentes, las cuales en un medio rico como el agua de peptona (utilizada para los aislamientos) germinarían y producirían células vegetativas. La presencia de los estafilococos no sería tampoco casual, puesto que los resultados moleculares apuntan que podría tratarse de *Staphylococcus warneri*, una bacteria encontrada en la piel humana (Sneath, *et al.*, 1986). Una incorrecta manipulación del producto por parte de los operarios podría ser la posible fuente de contaminación. Por último, tampoco es extraño encontrar *Arthrobacter* porque es una bacteria que se puede encontrar en el huevo, uno de los ingredientes esenciales de la mayonesa.

La identificación de la microflora inicial de la mayonesa se hizo mediante métodos tradicionales (bioquímicos) y moleculares (amplificación y secuenciación del ADN correspondiente al ARNr 16S). La identificación bioquímica requiere bastante experiencia, es lenta, tediosa y en algunas

ocasiones no es definitiva. Quizás las ventajas de la identificación molecular sean la sensibilidad y la rapidez. Sin embargo, hay que tener precaución si se quiere llegar a nivel de especie ya que suelen disponer de todas las secuencias ARNr 16S de todas las especies de un determinado género.

Conocer la microflora inicial de la mayonesa Ybarra, nos sirvió para saber los microorganismos tenían que ser especialmente considerados durante el diseño de los cebadores de la PCR para detectar *Salmonella* y *Shigella*.

Además, disponer de un método de identificación rápido, como la PCR combinada con la secuenciación, podría servir para conocer los microorganismos causantes del deterioro de un alimento. De hecho, la mayonesa puede deteriorarse, esencialmente, por la actividad de las levaduras del género *Saccharomyces* y por las bacterias del género *Lactobacillus*. Sin embargo, estos microorganismos deterioran el producto y mueren en el proceso, por lo que su aislamiento es complicado. En la fábrica de Ybarra hubo un antecedente de deterioro (E. Trujillo, comunicación personal), que se manifestó por un cambio del sabor y la aparición de malos olores en la mayonesa. El microorganismo responsable fue difícil de determinar, puesto que la mayonesa modificó sus características fisiológicas, es decir, se trataba de una estirpe adaptada a este medio. El microorganismo que produjo el deterioro se clasificó como *Lactobacillus plantarum*, y dado que se dispone de su secuencia ARNr 16S en las bases de datos, con el método de PCR y secuenciación hubiese sido rápidamente identificada.

Pretender establecer un único protocolo de PCR para una gran variedad de aplicaciones es una tarea difícil, por lo que es siempre aconsejable buscar las condiciones óptimas para cada reacción de PCR (Innis y Gelfand, 1990). Cuando la reacción no se efectúa en las condiciones óptimas aparecen problemas con la especificidad: no hay detección o la producción del producto amplificado es baja. Algunos de los aspectos particulares que pueden afectar al éxito de la reacción son (Hill, 1996): la secuencia de los cebadores, la temperatura de hibridación, el pH, la concentración del ion Mg^{+2} , el número de ciclos, el tiempo de polimerización, el tamaño del fragmento amplificado, la disponibilidad del ADN o la presencia de inhibidores.

Los resultados obtenidos en las amplificaciones utilizando las parejas de cebadores ISF/ISR y VIRAF/VIRAR mostraron que estos cebadores son altamente sensibles y específicos. Con ISF/ISR se amplificó el ADN aislado de la mayor parte de las estirpes de *Salmonella* (95,5%) y con VIRAF/VIRAR se amplificó el ADN aislado de todas las estirpes de *Shigella* y nunca se amplificó el ADN aislado de otras bacterias que no pertenecen a estos géneros (excepto con el ADN aislado de las estirpes EIEC que se amplificó con los cebadores para *virA*, puesto que estas bacterias contienen éste gen en su plásmido de virulencia). El éxito en las amplificaciones se consiguió por el alto grado de especificidad de los cebadores, por la utilización de altas temperaturas de hibridación (65°C) de los cebadores al ADN molde y por el empleo de una concentración óptima de Mg^{+2} (1,5 mM $MgCl_2$). La temperatura de hibridación es un factor crítico en los primeros ciclos porque si es baja permite el emparejamiento de los cebadores a regiones diferentes a la diana y disminuye la eficacia de la amplificación en los sucesivos ciclos (Ruano, *et al.*, 1992). La concentración del ion Mg^{+2} ha de ser óptima porque afecta a la temperatura de hibridación de los cebadores, a la temperatura de separación de las cadenas del ADN molde y amplificado, a la formación de dímeros entre cebadores y a la actividad y fidelidad de la polimerasa (Hill, 1996; Innis y Gelfand, 1990).

La calidad y cantidad del ADN molde no es un factor esencial en la reacción de amplificación. Los resultados obtenidos con la PCR utilizando células bacterianas que, efectivamente, no es necesario un ADN aislado y purificado sino que el ADN que se libera en un lisado celular sirve como molde de la reacción. Además, los niveles mínimos de detección de la PCR utilizando ADN o células de *Salmonella* y *Shigella* con sus respectivos cebadores específicos, demostraron que no es necesario una gran cantidad de ADN molde ya que incluso con una cantidad de ADN menor que la que pueda contener una célula se detectaron las (Figuras 14 y 15). Los niveles mínimos de detección observados en *Salmonella* con los cebadores ISF/ISR (25 fg o 1-10 células) y en *Shigella* con los cebadores VIRAF/VIRAF (1 fg o 1-10 células) son parecidos a los publicados previamente en otras bacterias y con otros cebadores. Así por ejemplo, utilizando 1 fg de ADN o 1-10 células de

Escherichia coli, (Bej, *et al.*, 1990) lograron amplificar y detectar mediante hibridación un fragmento del gen *lamB*. Enumerar todas y cada una de las publicaciones en las que se usa la PCR para la detección microorganismos sería interminable, sin embargo una información bastante completa se puede encontrar en dos recientes revisiones (Olsen, *et al.*, 1995; Hill, 1996). Los métodos empleados en esta tesis para la detección del ADN amplificado han sido la electroforésis en gel de agarosa, la hibridación en filtro (“southern y dot-blotting”) y la hibridación en pocillo (EIA) tienen sus ventajas e inconvenientes. Evidentemente, si se busca la detección de cantidades mínimas de ADN, las hibridaciones en filtro son los métodos más sensibles, siendo el “dot-blotting” el más rápido de realizar y el menos laborioso. Si se busca la rapidez, lo más acertado sería utilizar la electroforésis en gel de agarosa. Por último, si se desea una cuantificación se puede conseguir con el EIA.

Aunque la electroforésis en gel de agarosa es el método menos sensible, con ella hemos conseguido una sola célula de *Salmonella* y *Shigella* tras la amplificación por PCR. Así, por su sencillez y rapidez sería la PCR en combinación con la electroforésis sería el método aconsejable para detectar la presencia o ausencia de *Salmonella* y *Shigella* en la mayonesa. Sin embargo, la PCR combinada con el EIA permitiría la automatización que es un requisito importante para trasladar el método PCR a las industrias alimentarias. Otra ventaja que tendría la combinación PCR-EIA sería la posibilidad de cuantificar el ADN amplificado, y por extensión, la determinación del número de células que contaminan una muestra mayonesa. La cuantificación no es necesaria en el caso de la detección de *Salmonella* y *Shigella* en mayonesa, puesto que la ley tan sólo exige su ausencia en 25 g de producto. La cuantificación sí sería útil en el caso de la detección de las enterobacterias, puesto que la legislación exige determinar el número total en 1 g de mayonesa. Sin embargo, determinar el número de bacterias de una muestra de alimento mediante PCR-EIA sería complicado si fuera necesario un paso de enriquecimiento antes de la PCR, ya que el número de microorganismos de la muestra de alimento enriquecido sería superior al número de microorganismos del alimento en su origen (Vanechutte, 1997).

La detección de los microorganismos en alimentos se puede realizar mediante PCR utilizando directamente las células contenidas en una alícuota del alimento o tras un enriquecimiento por métodos tradicionales, utilizando directamente las células contenidas en una alícuota del medio de enriquecimiento (Olsen *et al.*, 1995). En estos dos casos la lisis celular ha de ser efectiva para que el ADN se libere de las células y éste sea accesible a los componentes de la reacción de amplificación. La PCR también se puede llevar a cabo aislando del alimento o del medio de enriquecimiento el ADN amplificable, extrayendo las células y aislando su ADN. Independientemente del método elegido algunos otros factores tales como (Rossen, *et al.*, 1992; Wilson, 1997) la degradación o captura del ADN y/o la inhibición de la reacción de amplificación pueden afectar al éxito de la reacción de PCR.

En este trabajo, la lisis celular se realizó mediante calor (Starnbach, *et al.*, 1989) ya que la lisis mediante detergentes (SDS, Triton X-100 o Tween 20) o NaOH podía inhibir la reacción (Rossen, *et al.*, 1992). Tampoco se extrajo el ADN puesto que las sustancias empleadas en el aislamiento del ADN pueden también producir inhibición (Rossen, *et al.*, 1992). Aunque otros autores han observado que la lisis por calor puede producir resultados no satisfactorios, por disminución de la sensibilidad o por la aparición de amplificaciones inespecíficas (Ganon, *et al.*, 1992), en todos los casos ensayados en esta tesis la lisis por calor fue efectiva puesto que siempre se obtuvieron productos de amplificación. Los problemas de la lisis por calor detectados por otros autores pudieron estar motivados porque el ADN tras el calentamiento no se separó satisfactoriamente de las proteínas estructurales de la célula o de las que están unidas al ADN. De cualquier forma, la lisis por calor tiene la ventaja de ser rápida si se compara con otros métodos de extracción de ADN y, en nuestro caso, fue suficientemente sensible como para que se detectaran 1-10 células de *Salmonella* o *Shigella*.

La detección de células de *Salmonella* o *Shigella* tras el enriquecimiento de la mayonesa en agua de peptona tuvo un problema añadido, la inhibición de la reacción de amplificación. La cantidad de mayonesa diluida en agua de peptona) tolerada en la reacción de amplificación fue un 10% del volumen final

de la reacción (esto es 5 μ L en un volumen final de reacción de 50 μ L). Rossen, *et al.*, 1992, observaron que un 10% de agua de peptona no inhibía la PCR, lo que está de acuerdo con nuestros resultados.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en los alimentos puede haber células metabólicamente dañadas que son difíciles de recuperar y, en consecuencia, no se detectan empleando los métodos tradicionales de control microbiológico. Sin embargo, este tipo de células dañadas si son detectables mediante la PCR. Igualmente, las células no viables pueden ser detectables mediante PCR y no lo son por medio de los métodos tradicionales, es decir, la PCR puede producir resultados denominados falsos positivos. Los falsos positivos de este tipo son especialmente evidentes en ciertos productos tales como los pasteurizados, en los cuales la PCR puede dar resultados positivos a pesar de que de ellos no se recuperen células viables. No obstante, la presencia de ciertos microorganismos, vivos o muertos, es un indicador de que el alimento no se preparó con ingredientes de calidad o que su manipulación no fue adecuada. En este tipo de alimentos, la presencia de microorganismos no viables se podría distinguir de los microorganismos viables analizando dos muestras del alimento tomadas con un intervalo de varias horas. Si el producto contiene células viables, éstas crecerán y la cantidad del producto PCR será mayor en la segunda muestra que en la primera, debido al incremento del ADN molde. Si el alimento contiene células no viables, no se produciría el incremento en la cantidad de producto PCR sino que incluso podría haber una disminución. La relación entre viabilidad de las células y detectabilidad mediante PCR no está clara, de hecho, hay datos contradictorios, así Bej, *et al.*, 1991, obtuvieron amplificación por PCR en células no viables de *Legionella pneumophila*, mientras que Masters, *et al.*, 1994, no consiguieron amplificación empleando células no viables de *E. coli* o *Listeria monocytogenes*. A pesar de que la PCR no sea un buen método para distinguir viabilidad de no viabilidad, la utilización del ARN y la retrotranscripción para producir un ADN molde podría ser una manera de salvar este problema, ya que la vida media del ARN es mucho menor que la del ADN.

Una de los principales problemas de la PCR como método de detección de microorganismos es la aparición de producto de amplificación a causa de la contaminación por ADN molde externo que generalmente procede de los productos de amplificación de reacciones anteriores. El problema de estos falsos positivos es mucho más acusado cuanto más bajo es el nivel de detección que se quiere alcanzar. Los falsos positivos se pueden evitar irradiando con luz ultravioleta (Sarkar y Sommer, 1990) o haciendo un tratamiento con la enzima ADN uracil glicosilasa (Longo, *et al.*, 1990) previamente a la reacción de PCR. El inconveniente de estos tratamientos es que reducen la efectividad de la reacción de PCR y por ello lo más aconsejable es tomar simples precauciones a nivel de laboratorio (Kwok e Higuchi, 1989). Desde la propia experiencia, y de todos los consejos propuestos en Kwok e Higuchi, 1989, hay que tener una especial atención en:

- (i) la elección de los controles positivo y negativo. Obviamente es importante que el control positivo no produzca una gran cantidad de amplificado.
- (ii) la separación física entre el lugar de la preparación de la reacción y la zona donde se manipulan los productos de amplificación.

Los nuevos métodos moleculares desarrollados para la detección de microorganismos en los alimentos, y en especial la PCR, tienen que ser minuciosamente evaluados con los métodos tradicionales y, aún más, tienen que ser validados para que se utilicen rutinariamente en el control microbiológico de los alimentos. Sin embargo, la primera barrera para su aplicación a nivel industrial es intentar sustituir un método, el cultivo, esencial en la microbiología alimentaria desde hace casi un siglo, por otro, la PCR, desarrollado tan sólo hace 10 años.

Los inconvenientes en la aplicación de la PCR en el control microbiológico de los alimentos se van superando poco a poco. Así, ya no es necesario emplear la radioactividad y es posible la automatización. De cualquier manera, la PCR tiene que superar la dependencia hacia los métodos de cultivo, que hace que emplear el término de "método rápido" no sea del todo acertado. El componente económico tampoco ayuda al uso habitual de la PCR,

ya que el gasto en la instrumentación, en los reactivos y en el entrenamiento de los operarios, es alto.

Al contrario que los métodos convencionales, la PCR tiene la ventaja de no requerir confirmación de los resultados obtenidos. De hecho, la aplicación actual de la PCR es como prueba confirmatoria (Olsen, *et al.*, 1995), necesaria cuando se obtiene un presunto positivo con los métodos de cultivo.

5. CONCLUSIONES

De los resultados mostrados en esta Tesis se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1ª. Se ha diseñado una pareja de oligonucleótidos (ISF/ISR) y un protocolo de PCR para la amplificación de un fragmento de unos 150 pb de la secuencia de inserción IS200, que permite detectar específicamente las bacterias del género *Salmonella*.

2ª. Se ha diseñado una pareja de oligonucleótidos (VIRAF/VIRAR) y un protocolo de PCR para la amplificación de un fragmento de unos 200 pb del gen *virA*, que permite detectar específicamente las bacterias del género *Shigella*.

3ª. La sensibilidad de los dos métodos permite detectar una sola célula de *Salmonella typhimurium* y de *Shigella. dysenteriae* en la reacción de PCR.

4ª. La utilización simultánea de los cebadores ISF/ISR y VIRAF/VIRAR en la PCR permite detectar *S. typhimurium* y *S. dysenteriae* en un sólo ensayo.

5ª. La aplicación de nuestros métodos de amplificación por PCR permiten detectar *S. typhimurium* y *S. dysenteriae* en mayonesa en un tiempo inferior a 24 h, lo que permitiría una reducción del tiempo de almacenamiento del producto recién elaborado con la concomitante reducción del coste de producción.

6. ABREVIATURAS

Ap: ampicilina.
BrEt: bromuro de etidio.
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.
Cfu: unidades formadoras de colonias.
CTBA: bromuro de hexadecil trimetil amonio.
Dig: digoxigenina.
EDTA: ácido etilen diamino tetraacético.
EIA: ensayo inmunoenzimático.
EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
NBT: nitroblue tetrazolium
pb: pares de bases.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
SDS: dodecil sulfato sódico.
SSC: tampón citrato sódico salino.
TBE: tampón Tris-borato-EDTA.
TE: tampón Tris-EDTA.
TER: tampón Tris-EDTA-ARNasa
Tm: temperatura media de fusión.
Tris: tris-hidroximetil aminometano.
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
2. Andrews, W.H., Poelma, P.L. and Wilson, C.R. (1984) Isolation and identification of *Salmonella* species, pp 7.01-7.18. *En: Association of Official Analytical Chemists (ed.); Bacteriological Analytical Manual of the Division of Microbiology Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 6th. AOAC, USA.*
3. Ausbel, F.M., Brent, R., Ringston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.D., Smith, J.A. and Struhl (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, USA.
4. Beck, S. and Pohl, F.M. (1984) DNA Sequencing with Direct Blotting Electrophoresis. *EMBO J.* **12**: 2905-2909.
5. Bej, A.K., Mahbubani, M.H. and Atlas, R.M. (1991) Detection of Viable *Legionella pneumophila* in Water by Polymerase Chain Reaction and Gene Probe Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 597-600.
6. Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J. Haff, L. and Atlas, R.M. (1990) Detection of Coliform Bacteria in Water by Polimerase Chain Reaction and Gene Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 307-314.
7. Birkenmeyer, L. and Armstrong, A.S. (1992) Preliminary Evaluation of the Ligase Chain Reaction for Specific Detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 3089-3094.
8. Cahill, P., Foster, K. and Mahan, D.E. (1991) Polymerase Chain Reaction and Q β Replicase Amplification. *Clin. Chem.* **37**: 1482-1485.
9. Chacon, F., Zaballos, J.M. y Vázquez, J.M. (1986) Aspectos legales en el control microbiológico de los alimentos. Normas consensuadas y su aplicación, pp 115-127. V Reunión Científica del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM.
10. D'Aoust, J-Y. (1989) *Salmonella*, pp 327-345. *En: Doyle, M.P. (ed.); Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, USA.*
11. Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984) A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the Vax. *Nucleic Acid Res.* **12**: 387-395.

12. Doetsch, R.N. (1981) Determinative methods of light microscopy, pp 21-33. *En*: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. (eds.); Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, USA.
13. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1988) Food Microbiology. Mc Graw-Hill Book Company, USA.
14. Gannon, V.P.J., King, R.K., Kim, J.Y. and Golstein Thomas, E.J. (1992) Rapid and Sensitive Methods for Detection of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef Using the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3809-3815.
15. Hale, T.L. (1991) Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species. *Microbiol. Rev.* **55**: 206-244.
16. Harrigan, W.F. and McCance, M.E. (1966) Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, USA.
17. Hayes, P.R. (1985) Food Microbiology and Hygiene. Elsevier Applied Science Publishers, USA.
18. Hernández Giménez, E. (1986) Importancia actual de la automatización de métodos en el control microbiológico de los alimentos, pp 53-60. V Reunión Científica del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM.
19. Hill, W.E. (1996) The Polymerase Chain Reaction: Applications for the Detection of Foodborne Pathogens. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **36**: 123-173.
20. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition. Williams and Wilkins, USA.
21. Holtke, H.J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K. and Kessler, C. (1990) Non-Radioactive Labelling and Detection of Nucleic Acids. II . Optimization of the Digoxigenin System. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371**: 929-938.
22. Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990) Optimization of the polymerase chain reaction, pp 3-12. *En*: Innis, M.S., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (eds.); PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, USA.

23. Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H. and Brow, M.A.D. (1989) DNA Sequencing with *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 9436-9440.
24. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. Gene **96**: 23-28.
25. Jay, J.M. (1978) Modern Food Microbiology. Litton Educational Publishing, USA.
26. Kaiser, C.S., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Press, USA.
27. Kwok, S. and Higuchi, R. (1989) Avoiding False Positives with PCR. Nature **339**: 237-238.
28. Lanzillo, J.J. (1990) Preparation of Digoxigenin-Labeled Probes by the Polymerase Chain Reaction. Biotechniques **8**: 620.
29. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. (1990) Use of Uracil DNA Glycosylase to Control Carry-Over Contamination in Polymerase Chain Reactions. Gene **93**: 125-128.
30. Mason, P.J. and Williams, J.G. (1985) Hybridisation in the analysis of recombinent DNA, pp 113-137. *En*: Hames, B.D. and Higgins, S.J. (eds.); Nucleic Acid Hibridisation. A Practical Approach. IRL Press, USA.
31. Masters, C.I., Shallcross, J.A. and Mackey, B.M. (1994) Effect of Stress Treatments on the Detection of *Listeria monocytogenes* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. J. Appl. Bacteriol. **77**: 73-79.
32. Mehlman, J.J., Andrews, W.H. and Wentz, B.A. (1984) Coliform bacteria, pp 5.01-5.07. *En*: Association of Official Analytical Chemists (eds.); Bacteriological Analytical Manual of the Division of Microbiology Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 6th.
33. Melman, F.J. (1984) *Shigella*, pp 9.01-9.05. *En*: Association of Official Analytical Chemists (eds.); Bacteriological Analytical Manual of the Division of Microbiology Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 6th.

34. Messer, J.W., Peeler, J.T. and Gilchrist, J.E. (1984) Aerobic plate count, pp 4.01-4.10. *En: Association of Official Analytical Chemists (eds.); Bacteriological Analytical Manual of the Division of Microbiology Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 6th.*
35. Moreno García, B. y García López, M.L. (1986) Calidad microbiológica de los alimentos: análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos. Bases científicas, pp 9-13. V Reunión Científica del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM.
36. Mossel, D.A.A. and Ingram, I. (1955) The Physiology of the Microbial Spoilage of Foods. *J. Appl. Bacteriol.* 18: 232-268.
37. Olsen, J.E., Aabo, S., Hil, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P.E., Popovic, T. Rasmussen, H.N. and Olsvik, Ø. (1995) Probes and Polymerase Chain Reaction for the Detection of Food-Borne Pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 1-78.
38. Parnes, J.R., Velan, B., Felsenfedd, A., Ramanathan, L., Ferrini, U., Apella, E. and Seidman, J.G. (1981) Mouse Beta 2-Microglobulin cDNA Clones: a Screening Procedure for cDNA Clones Corresponding to Rare mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2253-2257.
39. Ray, B. (1996) *Fundamental Food Microbiology.* CRC, Press, USA.
40. Real Decreto 858/1984, de 28 de Marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de salsas de mesa (1984). *Boletín Oficial del Estado* 112: 12829-12833.
41. Robles, J. And Doers, M. (1994) pGEM-T Vector Systems Troubleshooting Guide. *Promega Notes* 45: 19.
42. Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. And Rasmussen, O. (1992) Inhibition of PCR by Components of Food Samples, *Microbial Diagnostic Assays and DNA-Extraction Solutions.* *Int. J. Food Microbiol.* 17: 37-45.
43. Ruano, G., Pagliaro, E.M., Schwartz, T.R., Lamy, K., Messia, D., Gaesslen, R.E. and Lee, H.C. (1992) Heat-soaked PCR: An Efficient Method for DNA Amplification with Applications to Forensic Analysis. *BioTechniques* 13: 226-274.

44. Saiki, R.K. (1990) Amplification of genomic DNA, pp 13-20. *En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.); PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, USA.*
45. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-Directed Enzymic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491.
46. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
47. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.*
48. Sarkar, G. and Sommer, S.S. (1990) Shedding Light on PCR Contamination. *Nature* **343**: 27.
49. Sealeg, P.G. and Southern, E.M. (1982) Electrophoresis of DNA, pp 39-76. *En: Rickwood, D. and Hames, B.D. (eds.); Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A Practical Approach. IRL Press, USA.*
50. Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C. and Roberts, T.A. Jr (1980) *Microbial Ecology of Foods. Volume 1: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. Academic Press, USA.*
51. Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C. and Roberts, T.A. Jr (1980) *Microbial Ecology of Foods. Volume 2: Food Commodities. Academic Press, USA.*
52. Smittle, R.B. (1977) Microbiology of Mayonnaise and Salad Dressing: A Review. *J. Food Prot.* **40**: 415-422.
53. Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams and Willkins, USA.*
54. Southern, E.M. (1975) Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

55. Starnbach, M.N., Falkow, S. and Tomkins, L.S. (1989) Species-Specific Detection of *Legionella pneumophila* in Water by DNA Amplification and Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1257-1261.
56. Swaminathan, B. and Feng, P. (1994) Rapid Detection of Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**: 401-426.
57. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) of the International Union of Microbiological Societies (1988) Microorganisms in Foods. Book 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality. Blackwell Scientific Publications, USA.
58. Van Brunt, J. (1990) Amplifying Genes: PCR and its Alternatives. *Biotechnology* **8**: 291-294.
59. Van Logtestijn, J.G. (1987) Sanitary control in the meat production line: an introduction, pp 5-6. *En*: Smulders, F.J.M. (ed.); Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry. Elsevier Science Publishers, USA.
60. Vaneechutte, M and Van Eldere, J. (1997) The possibilities and Limitations of Nucleic Acid Amplification Technology in Diagnostic Microbiology. *J. Med. Microbiol.* **46**: 188-194.
61. Wachsmuth, K. (1989) *Shigella*, pp 447-459. *En*: Doyle, M.P. (ed.); Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, USA.
62. Wilson, I.G. (1997) Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741-3751.

EDUARDO VILLALOBO POLO

"Reacción en cadena de la polimerasa para la
detección de Salmonella y Shigella en mayonesa"

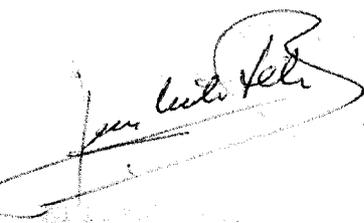
APTO "COM LAUDE"

POR UNANIMIDAD

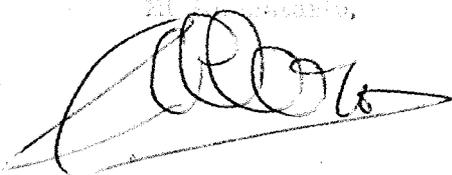
13

marzo

1998



El Vocal
Juan Alberto Cay
El Doctorado



Juan Alberto Cay