

**Universidad de Costa Rica  
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
Facultad de Microbiología**

**Estandarización de la Técnica de  
Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)  
para detección de *Salmonella* spp. en alimentos**

**Proyecto de graduación para optar por el grado académico de licenciatura  
en la carrera de Microbiología y Química Clínica**

**Cristina García Marín  
Carné universitario 981483**

**San José, 2005**



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA  
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el once de julio del año 2005, con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **CRISTINA GARCÍA MARIN**, carné 981483, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Alejandro Hernández Bolaños      **PRESIDENTE**  
Dr. José Gené Valverde  
Dra. Kenia Barrantes  
Dra. Gabriela Solano Trejos  
Dra. Ximena Cortés Bratti

**ARTICULO 1**

El presidente informa que el expediente de **CRISTINA GARCÍA MARIN**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

**ARTICULO 2**

La postulante **CRISTINA GARCÍA MARIN**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Estandarización de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detección de *Salmonella sp* en alimentos."

**ARTICULO 3**

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.



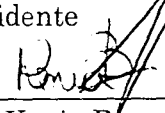
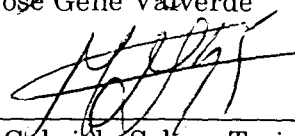
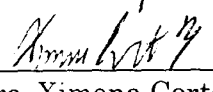

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y la Postulante, a las 15 50 horas.

 _____ Dr. Alejandro Hernández Bolaños Presidente	 _____ Dr. José Gené Valverde
 _____ Dra. Kenia Barrantes	 _____ Dra. Gabriela Solano Trejos
 _____ Dra. Ximena Cortés Bratti	 _____ Cristina García Marín Postulante

## *Índice General*

<b>Tema</b>	<b>Página</b>
Índice general	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Marco teórico	vi
Generalidades de <i>Salmonella</i> spp.	1
Patogenia de la salmonelosis	2
<i>Salmonella</i> : un problema mundial	6
La técnica de PCR	8
Objetivos	12
Materiales y Métodos	13
1. Estandarización de PCR	13
Extracción de ADN	13
Determinación del nivel de detección por cultivo y estudio de inhibidores	13
Reproducibilidad y Especificidad	14
2. Técnica de PCR	14
3. Electroforesis en gel de acrilamida de 8%	15
4. Electroforesis en gel de agarosa 2%	15
5. Estudio de inhibidores	16
6. Estudio de especificidad	16
7. Cultivo tradicional	16
Estudio con novobiocina	17
Resultados y Discusión	18
1. Estandarización de la PCR	18
1.1 Técnica de PCR	18
1.2 Estudio de reproducibilidad	23
1.3 Estudio de especificidad	24
1.4 Estudio de inhibidores	25

2. Cultivo tradicional	26
Conclusiones	29
Bibliografía	31
Apéndice: Cepas bacterianas empleadas en estudios de especificidad, reproducibilidad e inhibidores según laboratorio de procedencia	36

## *Dedicatoria*

*A Dios Todopoderoso y a mi Santísima Madre.*

*A mis padres Franklin y Aurelia, por ayudarme a levantarme y permanecer de pie.*

*A mis hermanos Francisco, Franklin y Daniela por su paciencia y apoyo en todo momento.*

*A mi querido Fabio por regalarme siempre una palabra de aliento.*

*A mi abuelita Alda.*

*A la memoria de mis abuelitos Arnulfo, Teresa y Célamo.*

## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi especial agradecimiento a la doctora Kenia Barrantes por brindarme la oportunidad de colaborar en este proyecto; gracias por su guía y serenidad a lo largo de este tiempo y por acompañarme en medio de frustraciones y alegrías.

Gracias por su apoyo y paciencia a las doctoras Ximena Cortés y Carolina Chaves.

También quiero recordar el apoyo que me ha manifestado el personal técnico de los laboratorios del Instituto de Investigaciones en Salud, principalmente a los señores Víctor Castillo y Jorge Quesada sin cuya asistencia este proyecto no hubiera concluido dichosamente.

## *Resumen*

*Salmonella* es uno de los agentes etiológicos más asociados a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) alrededor del mundo. Es agente causal de diarrea, afectando principalmente a personas con algún grado de inmunosupresión tales como niños y ancianos, a través del consumo de alimentos o agua contaminados.

Con la llegada del siglo XXI y el incremento de la población mundial, aumenta tanto en el comercio internacional como las migraciones poblacionales. Por esto existe la necesidad de implementar técnicas de detección de patógenos, con la sensibilidad y especificidad adecuadas, que proporcionen en poco tiempo resultados confiables relacionados a la inocuidad de los alimentos, o que faciliten la identificación del agente causal de un brote o epidemia.

Para la detección de *Salmonella* existe el método de referencia como lo es el cultivo tradicional, técnica confiable para su detección. Sin embargo, a pesar de su buena reproducibilidad y especificidad, es laborioso y requiere de varios días para obtener resultados, especialmente si se trabaja con gran número de muestras.

Esto justifica el uso de nuevas técnicas, con alta reproducibilidad, especificidad y sensibilidad, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que deben estandarizarse de acuerdo a las condiciones propias de cada laboratorio y de cada tipo de alimento debido a la presencia de inhibidores, para asegurar así su efectividad, y la validez diagnóstica en comparación al método de cultivo tradicional.



## Marco Teórico

### Generalidades de *Salmonella* spp.

Antes del siglo XIX, la fiebre entérica o tifoidea era confundida con el tifus (enfermedad causada por rickettsias). Fue gracias a los trabajos realizados por A. Louis (Francia, 1829) y William Jenner (Estados Unidos, 1850), que se logró diferenciar estas dos patologías.

En 1884 se obtuvo el primer aislamiento de *Salmonella typhi* realizado por el microbiólogo alemán Gaffkey a partir de bazos humanos y *S. enterica* fue aislada por Daniel Salmon (en cuyo honor se le dio nombre a este género bacteriano) en 1885 de intestinos de cerdos infectados. En 1896 se introdujo la primera vacuna realizada a partir de la bacteria muerta con calor, gracias a Pfeiffer y Kalle, y en este mismo año, Widal determinó que *S. typhi* aglutinaba con sueros de pacientes convalecientes, y esta misma técnica se usó para la identificación de *Salmonella* por Kauffman y White, proporcionando la clasificación que se utiliza en la actualidad (1).

Dentro de las características generales del género *Salmonella*, cabe recordar que es un bacilo Gram negativo, miembro de la familia Enterobacteriaceae, la cual incluye organismos con características tales como movilidad debida a flagelos peritricos o no móviles; son no esporulados; con crecimiento en peptona o en medios con extracto de carne sin cloruro de sodio o suplementos; son bacilos facultativos con la capacidad de fermentar glucosa y otros carbohidratos con frecuente producción de gas (2).

*Salmonella* además de poseer estas características generales, degrada azúcares mediante la vía Embden – Meyerhof, de manera que a partir del ácido pirúvico produce ácido fórmico. Lleva a cabo una fermentación ácido mixta y produce principalmente lactato, acetato, succinato, formato y etanol.

Para su identificación se usan pruebas bioquímicas tras un examen preliminar de su morfología (Gram), motilidad y crecimiento. Dentro de estas pruebas se consideran las siguientes como características de *Salmonella* spp.: oxidasa negativa;

movilidad positiva (flagelos peritricos); ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido) negativo; citrato positivo; ureasa negativa; manitol positivo (2, 3)

Existen documentados 2463 serotipos de *Salmonella* que afectan la salud humana así como de animales. La determinación de su nomenclatura es compleja y los diferentes sistemas dividen al género dentro de especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos (o serovariedades), lo cual es fuente de confusión en el ámbito científico.

La nomenclatura para el género *Salmonella* inicialmente consistía en un serotipo-una especie, de acuerdo al concepto introducido por F. Kauffmann el cual se basaba en la identificación serológica del antígeno somático (O) y el antígeno flagelar (H). Este concepto aún se usa en la determinación de las 2463 especies de *Salmonella* antes mencionadas. Se denominan los serotipos en base a características bioquímicas (3).

Se ha dividido al género en dos especies: *Salmonella enterica* (especie tipo) y *S. bongori*. Con base a similitud genética y rango de hospederos, *S. enterica* se divide en seis subespecies: *S. enterica* ssp *choleraesuis* (o *enterica* Grupo 1), *salamae* (Grupo 2), *arizonae* (Grupo 3a), *diarizonae* (Grupo 3b), *houtenae* (Grupo 4) e *indica* (Grupo 6) (4).

### **Patogenia de la salmonelosis**

La salmonelosis es causada por la ingesta de *Salmonella*, y varía de las enterocolitis autolimitada a enfermedades sistémicas. El tipo de enfermedad que se manifieste no solo depende del serotipo o la especie bacteriana sino también de la especie de hospedero infectado. Por ejemplo *Salmonella Typhi* es específica del ser humano provocando en él la fiebre tifoidea, mientras que *Salmonella Typhimurium* se relaciona a gastroenteritis autolimitada en personas inmunocompetentes, y puede originar severas infecciones sistémicas en ratones (5)

La gastroenteritis es producida por muchos serotipos de *Salmonella*; los más comunes son *Salmonella* ser. Enteritidis y *Salmonella* ser. Typhimurium. Se atribuye

usualmente a la ingestión de alimentos o agua contaminados por desechos fecales animales más que por desechos humanos; se asocia especialmente la carne sin cocinar, los mariscos y los huevos como causas principales de salmonelosis (1)

El periodo de incubación aproximado es de 8 – 48 horas, posteriormente el paciente puede padecer de náusea, vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre. La enfermedad es autolimitada y resuelve en aproximadamente 5 – 7 días sin tratamiento; son raras las complicaciones como la bacteremia. (1, 6).

Se ha estimado que la dosis mínima infecciosa es de alrededor de  $10^6$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC), sin embargo este número puede ser menor dependiendo de la susceptibilidad de la persona (de manera que se pueden ver más afectados aquellos con cierta inmunodeficiencia tales como enfermos de SIDA, o población susceptible cuyo sistema inmune aún está en desarrollo como los niños) también depende del tipo de cepa bacteriana como se citó anteriormente, y del tipo de alimento consumido (1).

En el curso de la infección por *Salmonella*, luego de su ingestión vía oral, la bacteria que logra sobrevivir el ácido pH estomacal y la competencia por parte de la flora normal intestinal así como otros factores (la tensión de oxígeno, sales biliares), se adhiere al epitelio intestinal y ataca e invade preferiblemente células fagocíticas profesionales. También se le puede encontrar en enterocitos no fagocíticos por un proceso complejo de estimulación, en el cual estas células internalizan a la bacteria luego de establecer un contacto estrecho con el borde en cepillo de los enterocitos. Esta unión produce la degeneración y elongación de los mismos, edema y un proceso llamado “membrane ruffling” (alteración semejante a un rizado de la membrana), con rearrreglos del citoesqueleto de actina y cambios morfológicos (1, 7, 8).

En la mayoría de los casos, la enfermedad en sí no es resultado del daño del tejido causado por esta bacteria, sino por la reacción del hospedero a los potentes factores proinflamatorios liberados, como es el caso de la diarrea inflamatoria inducida por la liberación de los gránulos de los neutrófilos. Posterior a la invasión de la mucosa, los neutrófilos son atraídos como parte de la respuesta inmune, y por producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-8, por parte de las células de la mucosa, y junto a esta migración de las células inmunes se observa la secreción de

electrolitos y fluidos (7, 9).

Una vez que la bacteria logra penetrar las barreras de protección del hospedero (pH estomacal, tensión de oxígeno, sales biliares, presencia de flora normal intestinal), migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos linfoides presentándose hiperplasia e hipertrofia. Por la respuesta inmune la infección se limita a nivel del tracto gastrointestinal, pero en este proceso se estimula la producción de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), y la secreción activa de líquidos, originando la diarrea (7).

Se conoce poco sobre la interacción de *Salmonella* con las células del hospedero, sin embargo según estudios realizados en animales, se han visto implicadas en esta interacción a las células M las cuales tienen la función de presentar antígenos intestinales. Las cepas de *Salmonella* invasivas logran ingresar a las células M gracias a la inducción de rearrreglos del citoesqueleto y endocitosis, y luego de causar lisis de las mismas, invaden tejidos profundos del intestino. Después de la adhesión e invasión a células epiteliales, se genera la proliferación intracelular y la permanencia en vacuolas endocíticas (5, 8, 10).

En el cuadro de fiebre tifoidea, *Salmonella* ingresa al organismo y luego de atravesar las barreras naturales, penetra la mucosa y llega a folículos linfoides (Placas de Peyer), donde se multiplica produciendo linfangitis. Por vía linfática llega a ganglios mesentéricos, luego va a sangre y de ahí al resto del organismo, afectando hígado, bazo y médula ósea. En casos severos puede producirse ulceración, hemorragia y perforación intestinal. Cerca del 3% de los pacientes no tratados pueden convertirse en portadores crónicos, algunos de los cuales refieren ser asintomáticos. Datos epidemiológicos indican que más de 2000 portadores estimados en los Estados Unidos son mujeres de tercera edad con enfermedad crónica biliar, para las cuales hay mayor incidencia de cáncer hepatobiliar que en la población general (1, 6).

En cuanto al mecanismo molecular por el cual se produce patogenicidad, análisis genómicos revelan que hay muchas variaciones en cuanto a los genes de virulencia asociados a aislamientos de *Salmonella*. Además, como anteriormente se

indicó, hay factores en el hospedero (hombre o animales) que determinan en mayor o menor grado la sobrevivencia de infección de la bacteria. Hay por tanto condiciones de susceptibilidad que predisponen a infecciones más severas por parte de *Salmonella* (9).

El proceso de invasión de *Salmonella* requiere de la expresión de proteínas de invasión que están codificadas en genes de virulencia. Estos genes se encuentran organizados en regiones del genoma conocidas como islas de patogenicidad. En *Salmonella*, esta información genética está codificada en un sistema de proteínas de invasión conocido como el sistema de secreción tipo III, donde se encuentra la proteína *invA*, la cual tiene la función esencial de facilitar la entrada a las células epiteliales según lo observado en estudios “in vitro”. La patogenicidad de *Salmonella* depende de su habilidad de ingresar a las células, por lo que la información almacenada en el locus *inv* es esencial (10, 11, 12).

Se cree que la proteína *invA* es una proteína integral de la membrana con dos dominios: uno hidrofílico amino-terminal (asociado a la membrana) y un dominio hidrofóbico carboxi-terminal que reside en el citoplasma (12).

Sobre la importancia de la proteína *invA* en los procesos de invasión de *Salmonella*, se ha observado que mutantes en *invA* limitan la habilidad de *Salmonella* para producir patogenicidad, debido a la disminución de acceso al epitelio intestinal; usando mutantes de *invA* de *S. Typhimurium* se imposibilita la invasión de células epiteliales “in vitro”, reduciendo la multiplicación intracelular bacteriana (10, 12, 13, 14).

*Salmonella* produce entonces una variedad de factores de virulencia que afectan el citoesqueleto de actina de las células del hospedero; para llevar a cabo su internalización en células no fagocíticas, provoca una serie de cambios en el citoesqueleto que son inducidos por la traslocación de proteínas bacterianas en la membrana celular. Al respecto, existen tres procesos bioquímicos generales establecidos: 1. Activación de pequeñas proteínas reguladoras del citoesqueleto, 2. La interacción de efectores bacterianos con la actina que promueven la polimerización y la unión de filamentos de actina y 3. La restauración de la dinámica normal de la actina con la consiguiente invasión de la bacteria.

Todo este proceso está mediado por genes presentes en la isla de patogenicidad I (SPI1). Luego de la invasión, la proliferación de *Salmonella* dentro de las células epiteliales depende de la información codificada en la isla de patogenicidad II (SPI2) (9, 12).

En general, dentro de los factores de patogenicidad de *Salmonella* que incluyen invasinas, toxinas y adhesinas se encuentra una compleja maquinaria contenida dentro de este pequeño microorganismo que puede causar infección y enfermedad. De ahí la importancia de detectar los genes de virulencia para clasificar una cepa patógena o no patógena. Debido a que el sistema de secreción tipo III es común a cepas virulentas, se explica su detección a través del uso de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (siglas en inglés) (11, 15).

Con respecto a esta técnica, existe gran variedad de iniciadores recomendados para la detección de *Salmonella*, incluyendo diversas secuencias para la detección del gen *invA*, conservando de esta manera la alta especificidad para la detección exclusiva de *Salmonella*, recordando la ventaja de la alta sensibilidad, sin dejar de lado los problemas de detección de microorganismos tanto viables como no viables (15, 16, 17).

### ***Salmonella*: un problema mundial**

La seguridad alimentaria ha adquirido gran importancia a nivel mundial por el incremento en el número de casos de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAs). Entre las principales causas para este incremento se encuentra el flujo comercial de alimentos, la globalización de los mercados, y las mejoras en los sistemas de salud para la detección y diagnóstico.

La incidencia global de ETAs es difícil de estimar, pero en el 2000 se registraron cerca de 2.1 millones de muertes debido a enfermedades diarreicas, donde una gran proporción de estos casos se atribuye a la contaminación de agua y alimentos. En los países en vías de desarrollo el problema es mayor por el amplio rango de este tipo de enfermedades. A esto se suma el subregistro de más de 100

veces para las ETAs. La alta prevalencia de enfermedades diarreicas, en muchas de estas regiones, sugiere mayores problemas de fondo en la seguridad alimentaria. Además aunque la mayoría de los casos de ETAs son esporádicos y frecuentemente subregistrados, se ha documentado brotes importantes como el producido por *Salmonella* en el año 1994 en los Estados Unidos, provocado por el consumo de helado contaminado, el cual afectó a cerca de 224 000 personas (18).

Son muchos los agentes implicados en las ETAs, incluyendo agentes químicos, virus, hongos (micotoxinas), parásitos y bacterias; entre estas últimas, *Salmonella* es uno de los patógenos implicados con mayor frecuencia en brotes asociados al consumo de carne, frutas, vegetales, huevo y derivados, mariscos y pescado en Estados Unidos.

A nivel mundial se reconoce la importancia de *Salmonella* como uno de los patógenos que constituyen una amenaza constante a la salud pública, por lo que es necesario centrarse en la vigilancia sobre ciertos aspectos tales como: 1) La amplia distribución de los alimentos (en cuanto al aumento en el tránsito de los mismos debido a la globalización). 2) La trazabilidad para identificar los alimentos relacionados a brotes por *Salmonella* y determinar su origen. 3) La resistencia antimicrobiana.

Recientemente, la incidencia de salmonelosis ha disminuido radicalmente en la Unión Europea, con un registro aproximado de la disminución en el número de casos declarados de 100.267 en 1997 (el año de máxima incidencia) a 73.006 en 2001 (19). Sin embargo ciertos datos indican que puede considerarse erróneamente bajo control, pues entre 1998-2001 se informó de 3.818 brotes de ETAs en España de los cuales el 38% (1.469) estaba relacionado con el consumo de huevos y derivados, y el 85,5% de los mismos se asoció a *Salmonella* (20). En este país se reconoce necesario implementar mejoras en inocuidad alimentaria tomando en cuenta que para el 2003 de los 356 brotes de salmonelosis detectados, fallecieron 10 personas (21).

Según datos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), en Estados Unidos se identificaron 15 600 casos de ETAs en el 2003, de los cuales en 6 017 se aisló *Salmonella*. En este mismo estudio, los más afectados fueron niños menores de 1 año y de 1 a 4 años de edad (22). Sin embargo, también se ha observado

una disminución en la incidencia de salmonelosis en este país, debida principalmente a la implementación en establecimientos de procesamiento de productos cárnicos y avícolas de los Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) (23).

Aunque en América Central y Sudamérica la incidencia de *Staphylococcus aureus* es ligeramente superior a la de *Salmonella*, ésta no pierde importancia en cuanto a gastroenteritis se refiere y se asocia principalmente al consumo de carne y huevos, así como a la carencia de agua potable en muchos de estos países (24).

En el 2002 en Brasil se registraron un total de 519 casos; en el mismo año en Panamá se determinaron 60 casos de salmonelosis y en Paraguay 23 personas enfermas por la misma etiología, sin embargo, no se reportaron fallecidos (25).

En Costa Rica se han realizado estudios para evaluar la contaminación microbiológica de los alimentos, dentro de los cuales se ha observado la presencia de *Salmonella* como patógeno asociado a alimentos tales como especias, coco, ensaladas tipo buffet, al huevo y derivados de pollo congelados (26).

La importancia de *Salmonella* como causante de gastroenteritis, no solo se observa en las estadísticas mundiales, ya que de acuerdo a los registros de salmonelosis en Costa Rica, en el año 2000 hubo un total de 92 casos, comparados con los 28 registrados en 1996 (27).

Dentro de los datos registrados en el Ministerio de Salud, durante el 2002 la provincia más afectada fue Puntarenas seguida por San José y Guanacaste; dentro de estos casos, la mayor incidencia en morbilidad se dio en niños menores de 1 año y de 1 a 4 años de edad (28). Sin embargo, se puede presumir que estos datos están subregistrados dada la posibilidad de asintomáticos, de personas que presentaran síntomas pero que no visitaron al médico, o bien, de personal médico que no registrara los casos.

### **La técnica de PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR constituye un avance importante en una rama de la ciencia: la biología molecular.



En la década de 1970 un descubrimiento provocó grandes progresos en la biología molecular: las enzimas de restricción, con las cuales se pueden clonar fragmentos de ADN. En 1985 Kary Mullis revolucionó el mundo con la invención de la reacción en cadena de polimerasa, la cual debe su nombre a la actividad de la enzima ADN polimerasa que permite crear una cadena de ADN a partir de su cadena complementaria. Con este método se logra la amplificación de un fragmento específico de ADN gracias a la multiplicación exponencial del mismo (29, 30).

La amplificación se logra a través de una serie de ciclos; cada ciclo incluye el uso de tres temperaturas diferentes y la adición de diversos reactivos según la temperatura de reacción, definiendo tres fases:

1. Desnaturalización a 94° C: se da la separación de las dos hebras de ADN.
2. Alineación: adición de iniciadores e hibridación de los mismos con su secuencia complementaria.
3. Extensión: la ADN polimerasa extiende una región de ADN que es complementaria al ADN blanco, con base a la posición del primer iniciador, en dirección 5' a 3'. Estos pasos se repiten de 25 a 35 veces, usando como blanco el fragmento inicial de ADN así como los productos creados en cada ciclo (30).

Entre las ventajas de la técnica se pueden enumerar la rapidez, la sensibilidad, la especificidad, la versatilidad, que no requiere de esterilidad microbiológica en cuanto a que se pueden analizar muestras de ADN obtenidas a partir de matrices complejas como alimentos. También se logran obtener resultados estandarizados, se facilita la accesibilidad de las muestras y la seguridad para la salud del personal gracias a la destrucción del posible patógeno, la cual se requiere para liberar el ADN.

Dentro de las desventajas se debe mencionar el riesgo de contaminación cruzada, la reproducibilidad, el acceso a equipo y reactivos, la inestabilidad de los reactivos, los cuales no permiten aplicar esta técnica a clínicas o centros de salud de atención primaria, sino a laboratorios más especializados. Además no puede diferenciar organismos viables de no viables y se requiere entrenamiento del personal

(30).

El estándar de oro para la determinación en el laboratorio de *Salmonella* según la AOAC (Association of Official Analytical Chemists International) es la técnica de cultivo tradicional (31), la cual por su confiabilidad y eficacia es reconocida a nivel mundial. Sin embargo, tiene la desventaja de requerir mucho tiempo y trabajo para obtener resultados. De ahí la búsqueda de nuevos métodos más rápidos e igualmente confiables. Las técnicas de biología molecular como la PCR son muy usadas a nivel mundial, pues se generan resultados en cuestión de uno o dos días, en comparación al método de cultivo tradicional que puede durar como mínimo 5 días.

Como se indicó anteriormente, ventajas de la PCR tales como su rapidez y sensibilidad la convierten en una importante herramienta de trabajo a pesar de su alto costo, por lo que se evidencia la necesidad de estandarizar técnicas para adecuar su uso en la detección de patógenos, esto para garantizar reproducibilidad intra e interlaboratorios, así como la funcionalidad de la técnica por medio de la determinación de la presencia de posibles inhibidores (32).

Debido a la posibilidad, en la técnica de cultivo tradicional, de no detectar bajas concentraciones de *Salmonella* en los alimentos, al llegar estos alimentos a las manos del consumidor pueden tener la dosis necesaria para causar infección, o bien, en estudios de casos clínicos pueden pasar desapercibidas para el personal de salud. Con la PCR puede obtenerse resultados en menor tiempo y de esta manera se facilita el diagnóstico.

Por medio de la técnica de PCR de *Salmonella*, se detecta el amplificado del gen *invA* (factor de virulencia común), determinando la presencia o ausencia de bacteria patógena en muestras de alimentos en menor tiempo, en comparación a la técnica de cultivo tradicional. Sin embargo esta última técnica tiene la ventaja de determinar viabilidad cuando el método molecular no lo hace (11).

Una de las muchas modificaciones a esta técnica es la conocida PCR “touchdown”. Un problema frecuente en la estandarización de una PCR es la falta de amplificación de la secuencia blanco, especialmente en genomas complejos. Esto se puede deber a la formación de secuencias inespecíficas en mayor número que aquella

secuencia deseada, por lo que el amplificado que se busca no se encuentra en la cantidad necesaria para ser observado. Además de la evaluación de las condiciones de reacción tales como concentración de los reactivos y las temperaturas de desnaturalización y alineación, una opción es el “touchdown”, donde se da aumento de la temperatura inicial de alineación de manera que se facilita la unión específica de los iniciadores, aumenta la cantidad de producto específico en cada ciclo, permitiendo la observación del producto final al obtener mayor producto amplificado; en la PCR “touchdown” la temperatura de alineación se disminuye un grado centígrado (por ejemplo) en cada ciclo, durante una cantidad de ciclos programada (por ejemplo, 10 ciclos) (33). Esta técnica permite mantener la especificidad de unión y de formación de nuevas cadenas de ADN, reduciendo el número de posibles productos incorrectos y aumentando el producto deseado (34).

Con el uso de esta técnica molecular se obtienen resultados en menor tiempo, con reproducibilidad y especificidad altas en la detección de patógenos, generando información confiable acerca de la presencia de *Salmonella* en alimentos (35).

## *Objetivos*

### **Objetivo General**

Estandarizar un método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Salmonella* en muestras de lechuga y comparar con la técnica de cultivo convencional.

### **Objetivos Específicos**

- Estandarizar un método de detección por biología molecular (PCR) para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en muestras de lechuga.
- Comparar el método de cultivo estándar para la detección de la presencia de *Salmonella* en lechuga y el método de PCR, inoculando muestras con cantidades conocidas de bacteria.
- Determinar la reproducibilidad de la técnica de PCR empleando diferentes cepas de *Salmonella* spp.
- Determinar la especificidad, utilizando cepas bacterianas diferentes a *Salmonella* spp.

## *Materiales y Métodos*

### **1. Estandarización de PCR**

#### **Extracción de ADN**

El ADN se obtuvo a partir de la extracción de cepas bacterianas por medio del método de choque térmico, a través del cual, con el uso de un baño de agua hirviendo (90 a 100° C) por un periodo de tiempo necesario (aproximadamente 10 minutos) se logra obtener el ADN a partir de colonias aisladas (30, 35). Para realizar estudios de inhibidores y especificidad de la PCR se usó la cepa de *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076, la cual también se empleó en el estudio por comparación del cultivo tradicional.

#### **Determinación del nivel de detección por cultivo y estudio de inhibidores**

Para los estudios de inhibidores y nivel de detección por la técnica de PCR se realizaron diluciones decimales por duplicado de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  UFC/mL de la bacteria (*Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076) con las cuales se inocularon muestras de 25 g de lechuga precortada de marca comercial para luego incubarlas 24 horas a 37° C en caldo lactosado simple (marca OXOID).

Luego de dicha incubación se tomaron muestras de 1 mL de cada una de las lechugas inoculadas (con diluciones de la bacteria) además de una muestra de la lechuga sin inocular (control negativo), que se incubó bajo las mismas condiciones, las cuales se usaron para la determinación de inhibidores (en el caldo lactosado empleado como medio de enriquecimiento, así como en la lechuga misma) y de sensibilidad por la técnica de PCR.

De cada muestra se tomó un mililitro que se transvasó a un tubo eppendorf estéril; se centrifugaron estos tubos durante 5 min a 14 000 rpm. Se tomaron los botones a los cuales se les realizaron 3 lavados con agua destilada estéril,

centrifugando a 14 000 rpm durante 5 min estas muestras entre cada lavado y descartando el sobrenadante.

Luego de los lavados se centrifugaron las muestras y de cada una se obtuvo un botón de células que se resuspendió en agua desionizada estéril para continuar con la extracción de ADN por medio de choque térmico; esto se logró al colocarlas en un baño de agua que tenía una temperatura de 90 – 100° C durante 10 minutos. Luego se centrifugaron las muestras, se separaron los sobrenadantes de cada una para trasvasarlos a tubos eppendorf estériles y se guardó este ADN extraído a una temperatura de – 70° C.

### **Reproducibilidad y Especificidad**

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento con 20 cepas bacterianas diferentes de *Salmonella* pertenecientes a la bacterioteca del INISA (Instituto de Investigaciones en Salud) y con 30 cepas de *Salmonella* suministradas por el laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología que se emplearon en el estudio de especificidad de la PCR (este número de cepas de *Salmonella* fue recomendado para determinar una muestra adecuada según la Dra. Doris Sossa de la Escuela de Estadística de la Universidad de Costa Rica), así como tubos de caldo lactosado que se incubaron de igual forma con *Salmonella* ATCC 13076 para comprobar que este medio no fuera inhibitorio para la PCR. De igual forma se conservaron los sobrenadantes a – 70° C. Las cepas bacterianas empleadas se señalan en el Apéndice 1.

## **2. Técnica de PCR**

Para la estandarización de la técnica se utilizó inicialmente una mezcla de reacción con los siguientes reactivos de marca Promega: Buffer Tris-HCl pH 8,3, MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Taq polimerasa.

Las secuencias de los iniciadores para la amplificación del gen de invasión *invA* de *Salmonella* spp. (14) se indican a continuación

<b>Región/gen</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Producto</b>
<i>invA</i>	Salm3 <b>5'-GCTGCGCGCGAACGGCGAAG-3'</b>	389 pb
	Salm4 <b>5'-TCCCGGCAGAGTTCCCATT-3'</b>	

Se emplearon tubos MicroAmp 0,2 mL para las reacciones de amplificación de las muestras en el termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400), para un volumen final de reacción de 25 µL que incluían 21 µL de mezcla de reacción, 3 µL de cada una de las muestras (ADN) y una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Con el programa de PCR touchdown, estas cantidades se modificaron de manera que los 25 µL para la reacción incluían 19 µL de mezcla, 5 µL de ADN y una gota de aceite mineral.

### **3. Electroforesis en gel de acrilamida 8%**

Posteriormente se realizó una electroforesis de este producto amplificado en gel de acrilamida 8%, el cual se preparó a partir de la mezcla de 5 mL de acrilamida al 8%, 50 µL de persulfato de amonio al 10% y 5 µL de TEMED (NNNN tetrametil etilendiamina); para la corrida se usó buffer TBE 1X pH 8,3, tomando 10 µL de cada muestra con 1µL del marcador de peso molecular de 50pb (Fermentas); se usó como control positivo el ADN de la cepa bacteriana *Salmonella* ATCC 13076. La corrida electroforética se realizó durante 50 minutos a 180 voltios.

### **4. Electroforesis en gel de agarosa 2%**

La PCR se estandarizó igualmente para visualizar los productos en gel de agarosa al 2% (14), usando para la corrida electroforética un buffer TBE (Tris-Borato) 1 X de pH 8,3.

Para aplicar las muestras en estudio se utilizó un buffer cargador de PCR 6X marca SIGMA, además de un marcador de peso molecular de 50pb (marca Fermentas), determinando la banda correspondiente a *Salmonella* (389 pb), de acuerdo a este marcador de peso molecular. La corrida se realizó durante 45 minutos a

160 voltios.

## **5. Estudio de inhibidores**

Este estudio se realizó para determinar la presencia de inhibidores de la PCR tanto en el caldo lactosado simple que se emplea como medio de pre-enriquecimiento de *Salmonella*, como en las lechugas empleadas.

Para tal efecto se incubaron diluciones decimales con la cepa de estudio (*Salmonella* ATCC 13076) desde  $10^5$  a  $10^2$  UFC/mL en caldo lactosado simple durante 24 horas a 35° C, de las cuales se extrajo el ADN. También se analizaron las muestras de ADN extraído de las lechugas inoculadas con *Salmonella*, así como ADN extraído de cepas puras de *Salmonella* ATCC 13076, utilizada como control positivo.

## **6. Estudio de especificidad**

Se realizaron extracciones de ADN de la cepa *Salmonella* ATCC 13076 y de otras 30 cepas de *Salmonella* provenientes del Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología y de la bacterioteca de INISA (ver apéndice).

Luego de las extracciones de ADN, se tomó el sobrenadante conservado a -70° C para llevar a cabo pruebas de especificidad usando la mezcla de reacción y el programa de PCR. Se verificó la amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa 2%.

## **7. Cultivo Tradicional**

Se emplearon muestras de lechugas empacadas y precortadas de marca comercial las cuales se inocularon con la cepa pura de *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076.

Para dicho inóculo se lleva a cabo una dilución de la cepa mencionada en agua peptonada estéril utilizando como comparación un McFarland 0,5 (con concentración



bacteriana de  $10^6$  UFC/mL).

Se pesaron porciones de 25 g de la lechuga en bolsas estériles para Stomacher y se inocularon con diluciones decimales desde  $10^1$  hasta  $10^6$  UFC/mL de *Salmonella* y se incubaron con 225 mL de caldo lactosado simple durante 24 horas a 35° C. Para determinar la cantidad de bacteria inoculada, se realizó un recuento de *Salmonella* con agar bilis rojo violeta (OXOID) que se incubó por 24 horas a 35° C.

Se continuó con el procedimiento en caldo tetracionato y selenito-cistina, para lo cual se incubaron las muestras durante 24 horas a 35° C.

Posteriormente se realizó un pasaje a medios selectivos y diferenciales tales como el desoxicolato citrato (DC) y en xilosa lisina desoxicolato citrato (XLD), a partir de los cuales se tomaron colonias sospechosas de *Salmonella* (Colonias blancas, translúcidas con o sin centro negro en DC. Colonias con punto negro en XLD) para identificación bioquímica (prueba de urea, movilidad, indol, citrato y TSI) y posterior confirmación serológica empleando el antisuero de *Salmonella* O antiserum poli A – I & Vi (31).

#### **Estudio con novobiocina**

Inicialmente de la dilución de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL se tomó para realizar diluciones con y sin novobiocina, para lo cual se preparó el antibiótico a una concentración de 50 mg/L, agregando a los 225 mL de caldo lactosado usado como pre-enriquecimiento, 2,5 mL de esta solución, obteniendo una concentración final de 0,5 mg/L de novobiocina.

Este estudio se realizó a la mitad de las bolsas con 25 g de lechuga para comparar el efecto producido por el antibiótico contra un control negativo de cada dilución. Luego se siguieron los pasos de incubación en este medio de pre-enriquecimiento a 35° C durante 24 h, y los posteriores pasos de enriquecimiento, uso de medios selectivos y diferenciales, bioquímica y serología (31).

## *Resultados y Discusión*

### 1. Estandarización PCR

#### 1.1 Técnica de PCR

Se llevó a cabo una serie de pruebas para determinar la concentración y cantidad óptima de reactivos para obtener amplificadas de la banda del gen *invA* de 389 pb, comenzando con los parámetros indicados en la literatura (14), los cuales se indican en el cuadro 1, haciendo posteriores modificaciones en cuanto a concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), concentración y cantidad de iniciadores.

**Cuadro 1. Pruebas realizadas para determinar mezcla adecuada de reacción para la amplificación del gen *invA* de *Salmonella* según concentración de reactivos**

Reactivos	Protocolos de Trabajo					
	1	2	3	4	5	6
Buffer	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$MgCl_2$ mM/ $\mu$ L	1,5	2,0	2,0	2,7	1,3	3,3
dNTPs mM/ $\mu$ L	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Taq polimerasa UI/ $\mu$ L	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Iniciadores $\mu$ g/ $\mu$ L	$4,0 \times 10^{-5}$	$8,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
Agua	-	-	-	-	-	-

Para estas pruebas se colocaron las muestras en el termociclador en el cual se diseñó un primer programa de amplificación de ADN que incluía estas condiciones:

- ✓ Temperatura de desnaturalización de 95° C durante 5 min
- ✓ 35 ciclos en los que cada ciclo corresponde a:
  - desnaturalización a 95° C, 90 segundos.
  - alineación a 62° C, 60 segundos.

- extensión a 72° C, 90 segundos.
- ✓ Temperatura de extensión de 72° C durante 7 minutos

Estos protocolos se evaluaron por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 8%, sin observar la banda en estudio en comparación al marcador de peso molecular.

En general, al realizar una estandarización de PCR, las condiciones experimentales se basan en un protocolo de referencia, que se debe adecuar a las condiciones propias de cada laboratorio. Basado en este protocolo, se realizan modificaciones en la mezcla de reacción, buscando optimizar la amplificación, las cuales se realizan por ejemplo, en pH, concentración de  $MgCl_2$  y en la temperatura de alineación. En cuanto pH, en general varía de 8,2 a 9,0 a 25° C, y debe recalcarse que este disminuye 0,03 unidades por cada grado centígrado que aumenta. Usando pH 8,3 a 25° C, se obtendrá un pH de 7,2 a una temperatura de alineación de 62° C, el cual es un pH óptimo para la actividad de la Taq polimerasa que varía de 7,0 a 7,5 (30 36).

En el segundo protocolo se observa la primera modificación: la elevación de la concentración de  $MgCl_2$ . El  $MgCl_2$  es un cofactor importante para la actividad de la polimerasa, cuya concentración óptima usualmente es de 1,0 a 3,0 mM. A menor concentración más eficiente es la alineación de los iniciadores. Sin embargo, concentraciones subóptimas pueden introducir amplificaciones inespecíficas, por lo que se recomienda la concentración de 1,5 mM para iniciar la optimización. Es importante considerar que la concentración óptima de  $MgCl_2$  puede verse afectada por la concentración total de desoxinucleótidos trifosfato o dNTPs, ya que estos últimos unen cationes divalentes, reduciendo la concentración efectiva de  $MgCl_2$  (30 36). En este protocolo, se observa una elevación de la concentración de  $MgCl_2$  sin cambios en la de los dNTPs, permitiendo una mayor concentración efectiva de  $MgCl_2$  con respecto al primer protocolo.

También se realizó una elevación en la concentración de los iniciadores. Los iniciadores son oligonucleótidos sintéticos generalmente de 15 a 30 nucleótidos de

largo, que son complementarios a una secuencia específica en el genoma del organismo de interés, por lo que su secuencia es lo que le brinda la especificidad a la reacción de amplificación. Para el diseño de los mismos se debe tomar en cuenta que no sea complementario a otros iniciadores en la reacción, que no tenga secuencias complementarias en si mismo para evitar la formación de lazos (30).

La única modificación que se observa en el protocolo número tres es la disminución en la concentración de los oligonucleótidos, esto debido a que la elevada concentración usada en el segundo protocolo puede provocar inhibiciones en la reacción y reducir la efectividad de la amplificación (30).

En los protocolos cuarto, quinto y sexto, se mantuvieron las concentraciones de los iniciadores, dNTPs, buffer, Taq polimerasa, buscando la concentración efectiva de  $MgCl_2$ .

En general, no se realizaron cambios en la concentración de la Taq polimerasa en ninguno de los protocolos de prueba. La Taq ADN polimerasa inicialmente se utilizó como una polimerasa termoestable purificada obtenida de *Thermus aquaticus*, reemplazada en la actualidad por la versión recombinante elaborada de un gen clonado de este organismo en *Escherichia coli*. Puede replicar aproximadamente 1 a 4 kilobases por minuto. Su concentración no se varió de la registrada en el protocolo de referencia (14, 30).

Los parámetros de temperaturas para la amplificación implican repetidos ciclos de diferentes temperaturas. El primer paso es la incubación a 95° C durante 30 a 60 segundos, antes del cual se puede dar una pre-desnaturalización como en este caso, donde se aplica esta temperatura durante más tiempo para favorecer la desnaturalización de la enzima. Seguidamente se da la alineación de los iniciadores u oligonucleótidos, y la temperatura elegida depende de los mismos iniciadores; a mayor temperatura es mayor la especificidad pero se obtiene menor producto amplificado. A bajas temperaturas aumenta la cantidad de productos inespecíficos

aunque aumenta el producto deseado. Para determinar esta temperatura, existe una fórmula que puede servir de guía, la cual asigna 4° C por cada par GC y 2° C por cada par AT:  $4(G+C) + 2(A+T) - 5^3$ . Según esta fórmula, para los iniciadores usados, se recomienda la temperatura de 70° C para el Salm3 y 60° C para Salm4. Por último está la extensión la cual se da a 72° C. Varía en tiempo de 20 a 60 segundos e incluso se puede extender de 1 a 5 minutos, dependiendo del largo del producto. El número de ciclos se establece de 25 a 35, e incluso 40, pero no se recomienda un mayor número debido al riesgo elevado de falsos positivos (30, 36).

Dado que estas modificaciones no fueron suficientes para permitir la amplificación del producto deseado (389 pb), se realizaron pruebas para determinar si se daba amplificación de *Salmonella* acoplando la mezcla de reacción a las condiciones de amplificación de *Shigella*. Por esto se varió el programa de acuerdo a las siguientes temperaturas de reacción:

- ✓ Temperatura de desnaturalización: 94° C, 1:30 minutos
- ✓ 25 ciclos donde cada uno incluye:
  - desnaturalización a 94° C, 1:30 minutos
  - alineación a 56° C, 1 minutos
  - extensión 72° C, 3 minutos
- ✓ Temperatura de extensión final de 72° C durante 5 minutos.

Luego de realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8% no se observó amplificación de las bandas correspondientes a *Salmonella*, mientras que las de *Shigella* si se evidenciaron, de manera que se comprueba la efectividad de la PCR y la electroforesis para la observación del producto amplificado para *Shigella*, pero no para *Salmonella*.

Por esta razón se realizaron cambios en la mezcla de reacción, así como en el programa de temperaturas y tiempos del termociclador para la amplificación de *Salmonella* como se indica a continuación:

**Cuadro 2. Mezcla de reacción utilizada para evaluar efectividad de PCR-  
“touchdown” para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp.**

Reactivos	Concentración final	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Buffer Tris-HCL pH 8,3	1 X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM/ $\mu\text{L}$	2,0
dNTPs	0,2 mM/ $\mu\text{L}$	0,5
Taq polimerasa	0,024 UI/ $\mu\text{L}$	0,12
Iniciadores	$1,0 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,5
Agua	-	12,12
DMSO	0,25 %	2,5

En esta mezcla se observa principalmente el aumento en la concentración de los iniciadores para mejorar la especificidad de la reacción, así como el uso del dimetil sulfóxido (DMSO Sigma). El DMSO permite optimizar la sensibilidad de la PCR al desestabilizar los puentes de hidrógeno presentes entre las bases en cadenas opuestas de la doble hélice, desestabiliza el ADN y facilita la amplificación, con la desventaja que puede originar productos inespecíficos (30, 37).

También se modificó el programa de amplificación de ADN que incluyó las siguientes condiciones:

- ✓ Temperatura de desnaturalización de 94° C durante 3 minutos
- ✓ 10 ciclos en donde se emplea el “touchdown” empezando con 94° C para la desnaturalización, una temperatura inicial de alineación de los iniciadores de 65° C (menos 1° C por ciclo) y una temperatura de extensión de 72° C.
- ✓ 25 ciclos utilizando las mismas temperaturas de desnaturalización y de extensión pero con temperatura de unión de 55° C.

Con la inclusión del paso correspondiente a “touchdown” se busca mejorar la reproducibilidad en cuanto a mejorar el grado de detección de cepas de la misma especie y facilita la diferenciación de otras bacterianas diferentes a *Salmonella*,

mejorando así la especificidad (35).

Debido a que este trabajo forma parte de un proyecto para estandarización de PCR para la detección de bacterias patógenas en alimentos que incluye *Shigella*, se determinó la efectividad de la reacción corriendo en conjunto con ésta bacteria, haciendo para la misma las correcciones en cuanto a concentraciones de iniciadores correspondientes a *Shigella*. Se corrió el producto amplificado por PCR en una electroforesis en gel de acrilamida 8% a 180 voltios, durante 120 minutos. Para ambas bacterias se observó amplificación. A partir de este momento se inició la evaluación de reproducibilidad, especificidad y presencia de inhibidores en las muestras de lechuga, para las cuales se muestran los resultados a continuación, en las pruebas evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

## 1.2 Estudio de Reproducibilidad

Se realizó un estudio con las cepas de *Salmonella* obtenidas del laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Universidad de Costa Rica, así como con cepas de la bacterioteca del Instituto de Investigaciones en Salud, indicadas en el Apéndice 1, para evaluar la reproducibilidad de la PCR en la detección de diversas especies de *Salmonella*. Se analizaron 30 cepas bacterianas las cuales amplificaron para el gen *invA* como se observa en las figuras 1, 2 y 3.

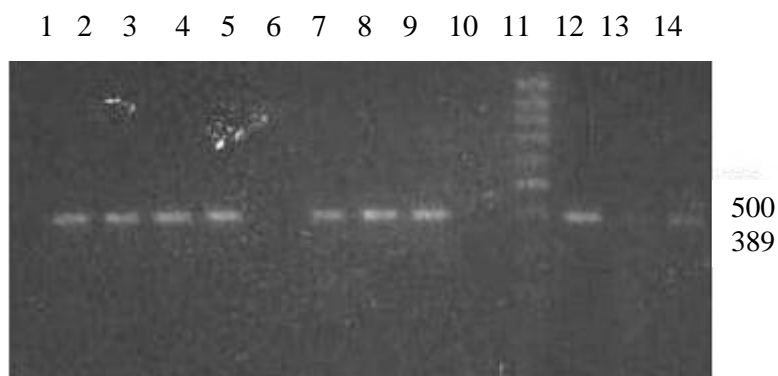


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la determinación de la reproducibilidad de la PCR. 1. Control Negativo; 2. Cepa 16; 3. Cepa 35; 4. Cepa 53; 5. Cepa 59; 6. No hay muestra; 7. Cepa 83; 8. Cepa 130; 9. Cepa 137; 10. No hay muestra; 11. Marcador molecular; 12. Control Positivo; 13. Cepa 21; 14. Cepa.36.

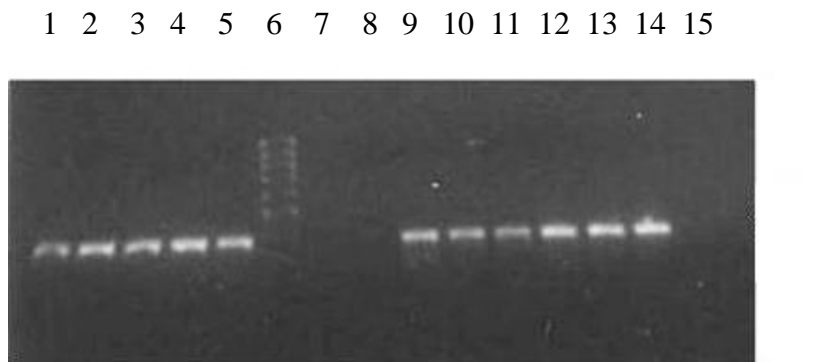


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la determinación de la reproducibilidad de la PCR. 1. Cepa 135; 2. Cepa 95; 3. Cepa 150; 4. Cepa 87; 5. Cepa 112; 6. Marcador Molecular; 7 y 8. No hay muestra; 9. Cepa 114; 10. Cepa 122; 11. Cepa 33; 12. Cepa ATCC 6539; 13. Cepa ATCC 19023; 14. Cepa ATCC 13076 (Control Positivo); 15. Control Negativo

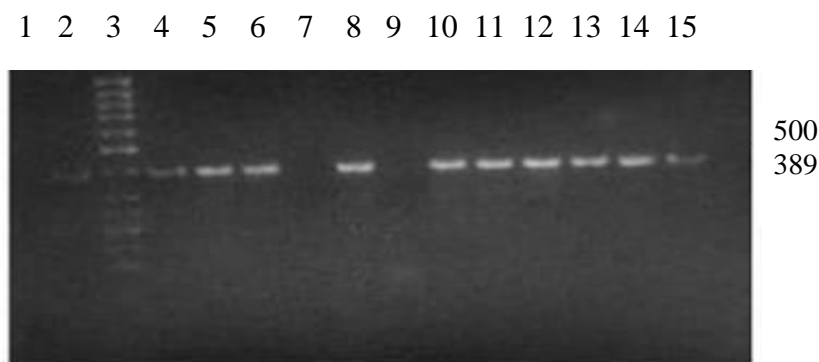


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la determinación de la reproducibilidad de la PCR. 1. Control Negativo; 2. Control Positivo; 3. Marcador Molecular; 4. Cepa 9; 5. Cepa 23; 6. Cepa 31; 7. No hay muestra; 8. Cepa 41; 9. No hay muestra; 10. Cepa 49; 11. Cepa 50; 12. Cepa 73; 13. Cepa 82; 14. Cepa 123; 15. Cepa 146.

### 1.3 Estudio de especificidad

En el estudio de especificidad, se evaluó con esta mezcla de reacción, la positividad por diferentes especies de *Salmonella* como se indicó en el apartado Métodos de Trabajo, siguiendo el esquema de trabajo de la PCR-touchdown. Se realizaron posteriormente electroforesis en gel de agarosa 2% para determinar la presencia de la banda de estudio (389 pb). No se observaron bandas que correspondieran al gen *invA* en estudio, de manera que se verifica la especificidad de



la reacción por *Salmonella*, sin embargo, se evidenciaron también bandas inespecíficas, pero que no interfieren con la interpretación del resultado (figuras 4 y 5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la determinación de la especificidad de la PCR. 1. Control Negativo; 2. *Plesiomonas shigelloides*; 3. Marcador Molecular; 4. *Proteus mirabilis*; 5. *Pseudomonas aeruginosa*; 6. *Citrobacter freundii*; 7. *Aeromonas hydrophyla*; 8. *Pseudomonas diminuta*; 9. *Moraxella phenilpiruvica*; 10. *Staphylococcus aureus*; 11. *Escherichia coli* 64111; 12. *E. coli* 286; 13. *E. coli* 75688; 14. *E. coli* 34420; 15. *E. coli* 341; 16. *E. coli* 25922; 17. *E. coli* (EPEC) 011; 18. *Vibrio cholerae*; 19. *Shigella* sp.; 20. Control Positivo

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la determinación de la especificidad e inhibidores (en lechuga) de la PCR. 1. Control Negativo; 2. Marcador Molecular; 3. *Shigella flexneri*; 4. *Shigella sonnei*; 5. *Enterobacter cloacae*; 6 y 7. No hay muestra; 8. Control Ambiental; 9. Control Negativo Lechuga; 10 y 11 Dilución 102; 12 y 13 Dilución 103; 14 y 15 Dilución 104; 16 y 17 Dilución 105; 18. Control Positivo.

### 1.4 Estudio de inhibidores

En el estudio por inhibidores, se observó el producto amplificado correspondiente a *Salmonella* en las muestras de lechugas inoculadas con diluciones bacterianas, así como en las diluciones preparadas con caldo lactosado hasta  $10^2$  UFC/mL. No hay inhibidores que interfieran con la PCR en los sustratos usados para la detección en el alimento de estudio (muestras de lechuga así como el caldo lactosado que constituye el medio de pre-enriquecimiento), tal y como se muestra en las figuras 5 y 6.

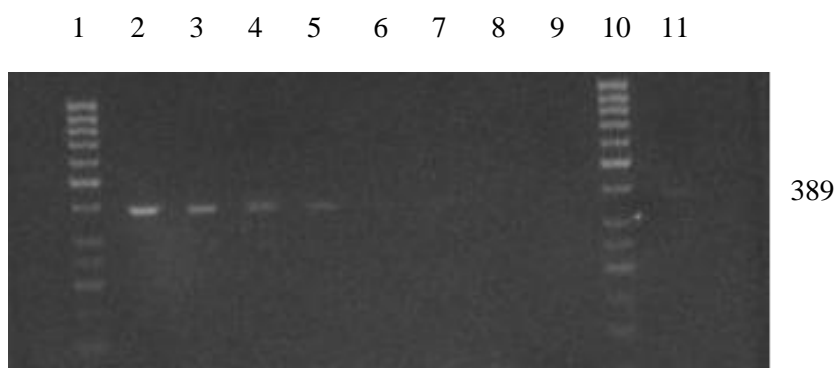


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la determinación de inhibidores de la PCR en el caldo lactosado. 1. Marcador Molecular; 2. Dilución  $10^7$ ; 3. Dilución  $10^6$ ; 4. Dilución  $10^5$ ; 5. Dilución  $10^4$ ; 6. Dilución  $10^3$ ; 7. Dilución  $10^2$ ; 8. Dilución  $10^1$ ; 9. Control Negativo; 10. Marcador Molecular; 11. Control Positivo.

## 2. Cultivo Tradicional

Se realizaron estudios usando novobiocina con el fin de obtener mayor crecimiento bacteriano inhibiendo otra flora bacteriana que pueda interferir en la recuperación de *Salmonella*. Sin embargo, luego de las incubaciones en los medios necesarios para su identificación (XLD y DC), se observó una diferencia en cuanto al aislamiento de *Salmonella* en diluciones mayores (de  $10^7$  a  $10^4$ ) entre el recuento de colonias de las diluciones bacterianas provenientes de la incubación en caldo lactosado con y sin novobiocina a una concentración de 50 mg/L. Esta prueba se realizó por duplicado (ver cuadro 3).

**Cuadro 3. Recuento aproximado de colonias sospechosas de *Salmonella* spp. a partir de medios diferenciales con y sin antibiótico**

Dilución	XLD				DC			
	Con novobiocina		Sin novobiocina		Con novobiocina		Sin novobiocina	
10 <sup>7</sup>	98	120	70	80	111	89	60	72
10 <sup>6</sup>	65	70	26	22	70	63	66	57
10 <sup>5</sup>	59	45	21	20	35	38	50	49
10 <sup>4</sup>	19	15	7	3	30	26	51	33

A dichas muestras se les realizó identificación bioquímica, verificando en cada plato cepas sospechosas de *Salmonella* que presentaran en TSI K/A con H<sub>2</sub>S, indol negativo, citrato positivo, urea negativa, movilidad positiva. Muestras con estas características se verificaron por serología, concluyendo que todas eran positivas e identificables como *Salmonella* spp.

Debido a que el procedimiento anterior se comprobó por duplicado con muestras diluidas hasta 1,5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL, se realizaron nuevas diluciones para determinar el límite de detección, así como el aislamiento con novobiocina.

A partir de un inóculo inicial de 1,1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL, se llevó hasta 1,0 x 10<sup>2</sup> UFC/mL, con y sin el antibiótico. En la lectura de los medios diferenciales se obtuvieron los siguientes resultados:

**Cuadro 4. Recuento aproximado de colonias sospechosas de *Salmonella* spp. a partir de medios diferenciales con y sin antibiótico**

Dilución	XLD				DC			
	Con novobiocina		Sin novobiocina		Con novobiocina		Sin novobiocina	
10 <sup>5</sup>	17	35	35	45	21	19	42	37
10 <sup>4</sup>	11	23	27	33	9	11	30	32
10 <sup>3</sup>	10	12	30	27	9	6	38	14
10 <sup>2</sup>	1	2	4	1	2	0	7	3

Dichas colonias se identificaron como *Salmonella* spp., luego de la

caracterización bioquímica y serológica. No se observa gran diferencia en la recuperación bacteriana a partir del uso del antibiótico con respecto a las muestras no tratadas con novobiocina en estas últimas diluciones (cuadro 4).

Las muestras tratadas con novobiocina y no tratadas se usaron para realizar la técnica de PCR y no amplificaron las que contenían el antibiótico; la novobiocina es un antibiótico natural (quinolona), producido por *Streptomyces*, usado en muestras de alimentos para facilitar el aislamiento de patógenos al inhibir la flora competidora. Su acción se da sobre Gram positivos, siendo inhibidor inespecífico de la ADN topoisomerasa II, la cual es una enzima implicada en el desenrollamiento y decatenación del ADN, lo que es necesario para su replicación (38); esto puede explicar porqué tal antibiótico es inhibidor de la reacción de amplificación.

Se observó la obtención de resultados en menor tiempo a través del uso de la PCR en comparación al método de cultivo tradicional, para el cual se observaron colonias sospechosas que se identificaron como *Salmonella* spp. hasta la dilución  $1 \times 10^2$  UFC/mL. A través de la amplificación, se determinó presencia – ausencia en las diluciones bacterianas sin novobiocina, en las cuales se observó positividad hasta la dilución realizada en lechugas de  $1 \times 10^2$  UFC/mL.

En el presente trabajo se determinó que existe el mismo límite de detección ( $1 \times 10^2$  UFC/mL) para ambos métodos y que la diferencia se establece con base en el tiempo necesario para la detección de cepas bacterianas, lo cual se traduce a la larga en protección al consumidor en cuanto a determinación temprana de posibles patógenos en alimentos, tomando en cuenta principalmente que la técnica molecular permite detectar factores de virulencia necesarios para *Salmonella* invasora, sin los cuales se ha observado reducción de su capacidad de invasión a células epiteliales experimentalmente.

## Conclusiones

- La amplificación de ADN por medio de la PCR es un método eficaz para detectar en forma rápida patógenos presentes en muestras, incluyendo alimentos como la lechuga, en comparación al método de cultivo tradicional que requiere más tiempo para obtener resultados (mínimo 5 días).
- Se obtienen resultados reproducibles y específicos a través de la PCR, comparando muestras procesadas por este método así como por el método de referencia.
- El procedimiento de “touchdown” es un paso que puede optimizar la reproducibilidad y especificidad de una reacción de amplificación por PCR, como se observó en el presente trabajo, donde facilitó la observación del gen en estudio (*invA*) al proporcionar mayor especificidad de unión dentro de las condiciones de reacción que se emplearon.
- Se observó el mismo nivel de de detección en el método de referencia utilizando muestras de lechuga inoculadas con cantidades conocidas de bacteria, y el método molecular utilizado; esto permite indicar que se logró una correcta estandarización de la PCR al igualar el límite de detección obtenido a través del método de cultivo tradicional de *Salmonella*, a partir de las mismas muestras de alimentos.
- La utilización de la novobiocina aunque se recomienda en el método de cultivo tradicional como inhibidor de flora bacteriana diferente de *Salmonella* presente en las muestras complejas de estudio, se observó que no facilita el aislamiento de esta bacteria al emplear altas diluciones de la misma, pues no se observó diferencia en los resultados a partir de la comparación entre muestras enriquecidas con y sin el antibiótico.

- Dada su capacidad de inhibir la topoisomerasa II, el uso de la novobiocina no es recomendado en procedimientos que incluyan la utilización de la PCR, ya que es inhibidor de la reacción de amplificación.
- El uso de medios de pre-enriquecimiento establecidos en la técnica de referencia para muestras como las lechugas (caldo lactosado) no interfiere o inhiben la PCR al igual que el sustrato presente en las muestras de lechuga. Por esto se puede indicar esta técnica como adecuada para la detección de *Salmonella* a partir de este tipo de muestras.
- La detección a través de la PCR del gen *invA* presente en cepas de *Salmonella* invasoras, constituye una gran ventaja sobre el método de cultivo tradicional, para identificar la positividad en muestras de alimentos por aquellas bacterias que pueden ser capaces de causar patogenicidad en humanos.



infection by *Salmonella* strains. Clin Immun. 114: 248 – 55.

10. Suarez, M., Rüssmann, H. 1998. Molecular mechanisms of *Salmonella* invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island 1. Internatl Microbiol. 1: 197 – 204.

11. Stuber, K., Frey, J., Burnens, A.P., Kuhnert, P. 2003. Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. Mol. Cell. Probes. 17: 25 – 32.

12. Ginocchio, C., Galen, J. 1995. Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium invA* family proteins. Infect Immun. 63: 729 – 32.

13. Lostroh, C.P., Lee, C.A. 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. Microbes Infect. 3: 1281 – 91.

14. Steel, O., Brumell, J., Knodler, L., Méresse, S., López, A., Finlay, B. 2002. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. Cell Microbiol. 4: 43-54.

15. Ferreti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, G., Clementi, F. 2001. Twelve-Hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp. In Food. Appl. Environ. Microbiol. 67: 977 – 8.

16. Olsen, J.E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P.E., Popovic, T., Rasmussen, H.N., Olsvik, O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. Int. J. Food Microbiol. 28: 1 – 78.

17. Maciorowski, K.G., Pillai, S.D., Jones, F.T., Ricke, S.C. 2005. Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. Critical Rev.



Microbiol. 31: 45 – 53.

18. World Health Organization. 2002. Food safety and foodborne illness. Fact sheet N° 237.

19. O'Brien, S. J., De Valk, H. 2003. *Salmonella* – un “viejo” organismo, un desafío constante. Eurosurveillance. 8: 29 – 31.

20. Hidalgo, J. R. 2004. Programa ministerial para el control de *Salmonella*. Fundación Grupo Eroski. Barcelona, España.

21. Álvarez, J. L. 2004. Diez personas murieron de salmonelosis durante el 2003. El Diario Montañés. España.

22. Center of Disease Control and Prevention. 2004. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food Selected Sites, United States, 2003. 53: 338-43.

23. Billy, T.J. 2002. Reducción de los peligros transmitidos por los alimentos, incluidos microbiológicos y de otro tipo, haciendo énfasis en los peligros emergentes. Foro Mundial FAO/OMS. Marrakech, Marruecos.

24. Hernández, M., Roig, A., Rodríguez, J. J. 2003. Seguridad Alimentaria en el Mundo. Fundación Grupo Eroski. Barcelona, España.

25. Organización Mundial de la Salud. 2002. Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. INPAZZ OMS – OPS.

26. Echandi, M.L., Antillón, F. 2000. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. Rev Biomed 11: 113 – 22.

27. Ministerio de Salud. 2000. Boletín de enfermedades de declaración obligatoria. 1996 – 2000. Unidad de Estadística. San José, Costa Rica.
28. Ministerio de Salud. 2002. Boletín Estadístico de las Enfermedades o Eventos de Notificación Obligatoria en Costa Rica el año 2002. Unidad de Información Estadística de la División de Vigilancia de la Salud. San José, Costa Rica.
29. Ramírez, N.A., Méndez, A., Cocotle, B.E., Arenas, J. 2003. Reacción en Cadena de Polimerasa. Rev. Med. Univ. Veracruzana.
30. Harris, E. 1998. A low-cost approach to PCR. Oxford U. Press, Inc. New York, United States. Pp 8 – 86.
31. Andrews, W.; Russell, F.; Silliker, J y Stan, J. 1998. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Pp. 357 – 80.
32. Malorny, B., Tassios, P., Randström, P., Cook, N, Wagner, M y Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int. J. Food Microbiol. 83: 39 – 48.
33. Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Mattick, J.S. 1991. “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucl Acid Res. 19: 4008.
34. Prilusky, J. What is “Touchdown” PCR?. 2005. BioGuide-PCR. Weizmann Institute of Science Genome and Bioinformatics.
35. Johnson, J., Clabots, C. 2000. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7: 258 – 64.
36. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. 1999. PCR Applications: protocols for

functional genomics. Academic Press. California, United States. Pp. 55 – 104.

37. Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D., Storts, D. 1998. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. Promega Notes N° 65. United States. p. 27.

38. El médico interactivo. 2001 – 2002. Principios básicos de antibioticoterapia.

## Apéndice

### Cepas bacterianas empleadas en estudios de especificidad, reproducibilidad e inhibidores según laboratorio de procedencia

Cepas Bacterioteca INISA	Cepas donadas por Facultad de Microbiología
<i>Salmonella</i> 021	<i>Salmonella</i> 009
<i>Salmonella</i> 031	<i>Salmonella</i> 016
<i>Salmonella</i> 033	<i>Salmonella</i> 023
<i>Salmonella</i> 036	<i>Salmonella</i> 035
<i>Salmonella</i> 041	<i>Salmonella</i> 053
<i>Salmonella</i> 049	<i>Salmonella</i> 059
<i>Salmonella</i> 050	<i>Salmonella</i> 073
<i>Salmonella</i> 095	<i>Salmonella</i> 082
<i>Salmonella</i> 146	<i>Salmonella</i> 083
<i>Salmonella</i> ser Enteritidis ATCC 13076	<i>Salmonella</i> 087
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> 112
<i>E. coli</i> 341	<i>Salmonella</i> 114
<i>E. coli</i> LT+ 286	<i>Salmonella</i> 122
<i>E. coli</i> ST+ 64111	<i>Salmonella</i> 123
<i>E. coli</i> ST+ / LT+ 75688	<i>Salmonella</i> 130
<i>E. coli</i> ST- / LT- 34420	<i>Salmonella</i> 135
<i>E. coli</i> (EPEC) 011	<i>Salmonella</i> 137
<i>E. coli</i> 25922	<i>Salmonella</i> 150
<i>Shigella flexneri</i> 397	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539
<i>S. flexneri</i> (OP)	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 19023
<i>S. sonnei</i> 433	
<i>Enterobacter cloacae</i> 296	
<i>Citrobacter freundii</i> 294	
<i>Moraxella phenylpyruvica</i> 136	
<i>Proteus mirabilis</i> 13	
<i>Vibrio cholerae</i> 56	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 28	
<i>P. diminuta</i> 230	
<i>Plesiomonas shigelloides</i> 212	
<i>Aeromonas hydrophyla</i> 35	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 22923	