



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**Evaluación de métodos moleculares para la detección de *Salmonella*
spp. en alimentos**

**Evaluation of molecular methods for the detection of *Salmonella* spp. in
foods**

AUTOR

Sergio Hernández Tambo

DIRECTORES

M^a Carmen Rota García

Cristina Escolar Miñana

Facultad de Veterinaria

2021-2022

ÍNDICE

Resumen.....	pág 1
Abstract.....	pág 2
1-. Introducción.....	pág 3
1.1. Características del G ^o <i>Salmonella</i>	pág 3
1.2. Casos y brotes de Salmonelosis.....	pág 4
1.3. Patogenia de la Salmonelosis.....	pág 5
1.4. Control en la industria alimentaria.....	pág 6
2-. Justificación y objetivos.....	pág 13
3-. Metodología.....	pág 14
3.1. Contaminación experimental de las muestras.....	pág 14
3.1.1. Matriz alimentaria.....	pág 14
3.1.2. Revivificación y concentración bacteriana.....	pág 14
3.1.3. Contaminación experimental.....	pág 15
3.1.4. Extracción de ADN.....	pág 15
3.1.5. Metodología aplicada para comparar los kits PCR y los	
Métodos de extracción.....	pág 15
3.2. Métodos de detección de <i>Salmonella</i> spp.....	pág 16
3.2.1. Método <i>Viasure Salmonella Real Time PCR Detection</i>	
<i>Kit</i>	pág 16
3.2.2. Método <i>IQ-Check Salmonella II</i>	pág 18
3.3. Métodos de extracción.....	pág 19
3.3.1. Método A: <i>Viasure RNA-DNA</i>	pág 19
3.3.2. Método B: <i>Viasure Resp. Viruses Quick Lysis</i>	
<i>Reagent</i>	pág 20
3.3.3. Método C: <i>Viasure Resp. Viruses Quick Lysis Reagent</i>	
optimizado.....	pág 20
3.3.4. Método D: <i>Nucleomag Dx Pathogen Kit</i>	pág 21
3.3.5. Método E: <i>Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction Kit</i>	pág 23
4-. Resultados y discusión.....	pág 24
4.1. Evaluación del método <i>Viasure Real Time PCR Detection Kit</i> frente al	
método validado <i>IQ- Check</i> en muestras de alimentos.....	pág 24
4.2. Evaluación de la sensibilidad del <i>kit Viasure Real Time PCR Detection</i>	
de detección de <i>Salmonella</i> spp. diferentes métodos de extracción.....	pág 27
5-. Conclusiones.....	pág 34
Conclusions.....	pág 35
6-. Valoración personal.....	pág 36
7-. Bibliografía.....	pág 37

RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria que está cobrando más importancia en la actualidad debido al aumento de casos que están apareciendo entre la población.

Para garantizar la seguridad alimentaria, los operadores de la industria alimentaria deben cumplir con los criterios microbiológicos establecidos para *Salmonella* spp. en una gran variedad de alimentos, entre los que se encuentra la carne picada y preparados de carne a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados (Reglamento (CE) nº 2073/2005). Dicho reglamento indica los métodos analíticos de referencia para la detección de esta bacteria, pero éstos presentan algunos inconvenientes. Por este motivo, se requieren métodos más rápidos, sencillos, fiables y económicos, siendo la técnica de PCR a tiempo real una buena alternativa.

Por ello, se evaluó el kit comercial de la empresa Certest Biotec *Viasure Real Time PCR Detection Kit*, desarrollado para la detección de *Salmonella* en muestras humanas y se comparó con el método IQ-Check (validado por AFNOR) diseñado para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos; ambos métodos se basan en la utilización de PCR a tiempo real. Paralelamente, se han evaluado un total de 5 métodos de extracción de ácidos nucleicos (ADN) a partir de una matriz alimentaria burger meat contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de la cepa *Salmonella* Enteritidis CECT 4155.

El método *Viasure* mostró buenos resultados frente al método validado *IQ-Check*. Los resultados del ensayo mostraron que el kit comercial *Viasure Real Time PCR* presentaba una buena sensibilidad empleando el método de extracción *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction* en muestras alimentarias, aunque existen variaciones en función del método de extracción empleado. Por lo tanto, podría considerarse a falta de un estudio completo de validación, como una alternativa viable para la detección de este *Salmonella* en preparados cárnicos.

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the foodborne diseases that is currently becoming more and more important due to the increase of cases that are appearing among the population.

For this reason, in order to ensure food safety, Regulation (EC) Nº 2073/2005 establishes the microbiological criteria for *Salmonella* spp. in those foods in which this pathogen can be present more often (eggs and egg products and meat products), as well as it indicates the analytical methods for the detection of this bacteria. However, these methods have a number of disadvantages as they require long execution time and complexity. For these reasons, the food industries demand faster, simpler, more reliable and economic methods, being the real-time PCR a good alternative.

For this reason, the commercial kit of the company Certest Biotec Viasure Real Time PCR Detection Kit, designed and developed for the detection of *Salmonella* in human samples, was evaluated and compared with the IQ-Check method (validated by AFNOR) designed for the detection of *Salmonella* spp. in food; both methods are based on the use of real-time PCR. Concurrently, a total of 5 methods of extracting nucleic acids (DNA) from a burger meat food matrix experimentally contaminated with different concentrations of the *Salmonella* Enteritidis CECT 4155 strain have been evaluated.

The Viasure method showed good results against the validated *IQ-Check* method. The assay results showed that the *Viasure Real Time PCR* commercial kit had good sensitivity using the *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction* method in food samples, although there are variations depending on the extraction method used. Therefore, with a complete validation study, it could be considered as a viable alternative for the detection of this *Salmonella* in meat preparations.

1-. INTRODUCCIÓN

Según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son aquellas que están causadas por el consumo de productos alimenticios o agua contaminados por microorganismos patógenos, como bacterias, virus y parásitos. En la actualidad, las ETAs suponen un gran impacto en la sociedad desde el punto de vista sanitario y socioeconómico, por lo que cada vez más, las instituciones adoptan enfoques integrados de seguridad alimentaria cuyo objetivo principal es la protección de los consumidores garantizando la Salud Pública, comprendiendo todas las etapas desde la granja a la mesa (EFSA, 2021).

Dentro de las ETAs, una de las más frecuentes es la salmonelosis, una enfermedad de origen bacteriano por el género *Salmonella*. La principal problemática de esta enfermedad se debe al incremento de casos que se ha producido en los últimos años. La alta incidencia de la enfermedad radica en parte a la elevada capacidad; que presenta esta bacteria, de adaptación a distintas condiciones, siendo capaz de sobrevivir en ambientes diferentes durante períodos de tiempos prolongados. Por esta razón, *Salmonella* spp. es uno de los principales agentes responsables de casos y brotes de infecciones de origen alimentario a nivel europeo, siendo únicamente superada por la campylobacteriosis (ELIKA, 2021).

1.1. Características del Gº *Salmonella*

Salmonella spp. se caracteriza por ser bacilos Gram negativo, no esporulados, móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos, ubicuosa, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Existen hasta más de 2500 serotipos diferentes, pero los de mayor prevalencia en la mayoría de los países de la Unión Europea (UE), son *Salmonella entérica* serotipos Typhimurium y Enteritidis (AESAN, 2022). Se trata de un microorganismo mesófilo, por lo que su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C, aunque es capaz de crecer a temperaturas comprendidas entre 5,2-46,2°C. Puede crecer en un amplio rango de pH comprendido entre 3,8-9,5, siendo su pH óptimo de 7-7,5. Además, es capaz de sobrevivir a valores de actividad de agua (*aw*) de hasta 0,93, siendo su valor óptimo de 0,99. Según la ELIKA (2021), la temperatura y el tiempo son los dos factores claves para el crecimiento de *Salmonella*. Todos estos datos se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de crecimiento y supervivencia de *Salmonella*

	Valor Mínimo	Valor Máximo	Óptimo
Temperatura (°C)	5,2	46,2	37
pH	3,8	7	9.5
Aw	0,93	0,99	0,99

1.2. Casos y brotes de salmonelosis

Se ha detectado un elevado número tanto de casos esporádicos como de brotes de salmonelosis por consumo de alimentos en todo el mundo.

Los últimos datos publicados por la EFSA señalan que, en el año 2020, se notificaron 52702 casos confirmados de salmonelosis en humanos en la UE, con un total de 6149 hospitalizaciones y 57 muertes, lo que supone una tasa de morbilidad elevada pero muy baja mortalidad. La salmonelosis en la UE en el año 2020 presentó una tasa de incidencia de 13,71 casos por cada 100000 habitantes. Por otro lado, se notificaron 694 brotes de origen alimentario en 22 Estados Miembros (EM) de la UE, lo que causó un total de 3686 casos, de los cuales 812 fueron hospitalizaciones y 7 defunciones. Estos datos muestran que *Salmonella* spp. fue responsable del 22,5% del total de brotes alimentarios en 2020, siendo la salmonelosis la segunda infección gastrointestinal transmitida por los alimentos en humanos y la principal causa de brotes alimentarios entre los EM de la UE (EFSA y EDCA, 2020). Sin embargo, estos datos son inferiores a los notificados en años anteriores debido a la reciente pandemia mundial COVID-19 (por lo que no representa la situación real) y la salida de Gran Bretaña de la Unión Europea.

En 2019, se notificaron un total de 87923 casos confirmados de salmonelosis, con un total de 16628 hospitalizaciones y 140 muertes. Además, *Salmonella* fue identificada en 926 brotes de origen alimentario, que supusieron un total de 9169 casos en humanos en la UE, con 1915 hospitalizaciones y 7 muertes (EFSA Y EDCA, 2019).

En España, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), notificó en el año 2018 un total de 292 brotes, con 2027 casos y 2 defunciones, en 13 Comunidades Autónomas (CCAA), Ceuta y Melilla; sin embargo, la vigilancia de esta enfermedad no está implantada en todas las CCAA por lo que estas cifras no son una representación del impacto que supone la salmonelosis en el territorio nacional y

cabe prever que los casos notificados sean superiores tanto en la actualidad como en los próximos años. Aunque las tasas de mortalidad asociadas a salmonelosis no son elevadas, esta enfermedad supone un problema de salud pública debido a su alta tasa de morbilidad en la población.

Otra de las causas que favorecen la alta incidencia de salmonelosis entre la población es la variabilidad de alimentos implicados en la transmisión de la bacteria. Entre ellos, destacan principalmente los huevos y ovoproductos y la carne cruda de cerdo, pavo y pollo (EFSA, 2020). Según el último informe sobre zoonosis de One Health de la Unión Europea de la EFSA, de un total de 694 brotes de origen alimentario causados por *Salmonella* en el año 2020, en un 45% de los brotes los alimentos implicados fueron huevos y ovoproductos y en un 9.8% tanto productos de panadería como por carne y productos cárnicos.

1.3. Patogenia de la salmonelosis

Los dos serotipos predominantes son *S. Typhimurium* y *Entititidis*, aunque todos los serotipos son igualmente patógenos y suponen un riesgo para la salud pública, como por ejemplo *S. Infantis*, *S. Dublin* o *S. Choleraesuis*, entre otros (De Oliveiria et al., 2003). El gen implicado en la patogenicidad es el gen *invA*, siendo un gen altamente conservado entre los serotipos patógenos de *Salmonella* entérica (De Oliveira et al., 2003; Das et al., 2012). Sin embargo, existen otros genes implicados en la patogenicidad como son el gen *misl* y el gen *ycir* (Silva y López, 2011).

La infección producida por *Salmonella* spp. se debe a la liberación de una endotoxina que tiene diversos efectos biológicos como fiebre aguda, dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, cefalea, mialgias, y otros síntomas sistémicos. El período de incubación varía entre las 6 y 72 horas después de la ingesta de alimentos contaminados con *Salmonella*, y la duración de la enfermedad es de 2 a 7 días. (AESAN, 2022). Como se ha comentado anteriormente, no es una enfermedad que presente una tasa de mortalidad elevada, en la mayoría de los casos presenta una sintomatología leve, con una rápida recuperación. Sin embargo, en pacientes más vulnerables, como niños pequeños o ancianos, la enfermedad puede originar un cuadro de deshidratación que puede llegar a poner en peligro la vida. Por el contrario, en mujeres embarazadas no parece presentar un mayor riesgo. En casos graves, puede provocar una infección sistémica (bacteriemia), la cual raramente aparece (aproximadamente en un 5% de los casos), siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos, pudiendo cursar con meningitis, encefalopatía, neumonía, celulitis o artritis (AESAN, 2022).

1.4 Control en la industria alimentaria

Dentro del marco legal europeo, los operadores económicos de la industria alimentaria tienen la responsabilidad de suministrar alimentos seguros, en su uso esperado, lo que requiere la implantación en la industria de herramientas de control específicas.

Tal y como señala el Reglamento (CE) nº 852/2004, el operador económico debe llevar a cabo la aplicación e implantación de una herramienta específica de autocontrol como es el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC), basado en los siete principios del APPCC del Codex Alimentarius, mediante el control de los peligros significativos específicos de un determinado proceso. Además, debe de garantizar un ambiente higiénico en el proceso productivo del cual es responsable, mediante la implantación de los Planes Generales de Higiene (PGH), basados en los principios generales de la higiene alimentaria.

Por ello, para verificar que el operador económico establece las medidas de higiene generales y específicas contempladas en los Reglamentos (CE) nº 852/2004 y 853/2004, se deben de llevar a cabo análisis microbiológicos, tanto de los productos alimenticios como de las superficies y ambientes de trabajo, para comprobar que se encuentran dentro de los valores establecidos por la legislación pertinente.

Los criterios microbiológicos y las normas de aplicación que deben de cumplir los explotadores de industrias alimentarias se encuentran recogidos dentro del Reglamento (CE) nº 2073/2005, el cual incluye tanto los criterios de seguridad alimentaria, que garantizan la inocuidad de los alimentos, como los criterios de higiene del proceso, que garantizan la higiene en el proceso productivo.

Acorde a este Reglamento, se establece un criterio de seguridad alimentaria para *Salmonella* spp. en diferentes categorías de alimentos entre las que se incluye la carne y productos cárnicos, concretamente, carne picada y preparados de carne a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados, estableciendo el siguiente criterio: n=5, c=0, m y M=no detectado/25g para aquellos productos comercializados durante su vida útil.

Dicha normativa, establece como método de referencia para la detección de *Salmonella* spp. el método EN/ISO 6579. Este método incluye 4 pasos basados en el uso de técnicas de microbiología convencional:

1. Preenriquecimiento en medio no selectivo.
2. Enriquecimiento selectivo.
3. Aislamiento en medios selectivos agarados.

4. Identificación bioquímica.

Sin embargo, este procedimiento conlleva una serie de inconvenientes, como el tiempo de análisis que es de al menos una semana para obtener un resultado confirmado, además del tiempo requerido para la serotipificación. Para muchos productos alimenticios, especialmente los productos frescos, este período de tiempo es demasiado largo para garantizar su seguridad antes del consumo, ya que deben ser almacenados hasta la obtención de los resultados. Por otro lado, el método incluye la utilización de gran cantidad de medios de cultivo, personal técnico y requiere grandes superficies de espacio de trabajo, especialmente si se están analizando un elevado número de muestras (Karen et al., 2016). Sin embargo, el propio Reglamento (CE) nº 2073/2005 permite llevar a cabo otros tipos de métodos analíticos alternativos para la detección y cuantificación de microorganismos, siempre y cuando, estén validados por un organismo de certificación en relación con el método de referencia.

Para suplir estos inconvenientes, la alternativa más prometedora para la industria alimentaria es la utilización de métodos basados en la biología molecular, cuyas principales ventajas son la rapidez, la sensibilidad y especificidad de detección (Martín, 2016).

Entre los diferentes métodos moleculares, se encuentra la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica permite la síntesis *in vitro* de millones de copias de un segmento específico del ADN (Pedrosa, 1999), debido a una intensa catálisis llevada a cabo por una enzima denominada ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas para analizarse posteriormente (Tamay de Dios et al, 2013).

Para que la reacción de amplificación tenga lugar se requiere de los siguientes elementos:

- La muestra de ADN (molécula formada por una doble hebra unida mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas).
- La enzima responsable de la reacción. La enzima más usada para llevar a cabo la reacción es la Taq ADN polimerasa, cuya función es la síntesis de las nuevas cadenas de ADN. Su alta empleabilidad para esta técnica se debe a que es una enzima termoestable, capaz de sintetizar a altas temperaturas, una característica que supone una gran ventaja respecto a otras enzimas.
- Oligosacáridos o dNTPs (adenina, timina, citosina y guanina) que son las bases de nitrogenadas a partir de los cuales la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN.

- Los primers o cebadores (directo y reverso), que son cadenas de oligonucleótidos de aproximadamente 20-25 pares de bases y que determinan la secuencia que se quiere amplificar y por lo tanto sintetizar.
- Magnesio (Mg ⁺) es el cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por lo que es muy importante que la concentración de este sea la adecuada que oscila entre 0,5 y 2,5 mM.
- Solución tampón o buffer.
- Agua es el disolvente de la reacción. Se utiliza agua destilada de grado Milli Q, libre de nucleasas u otras enzimas que puedan degradar los ácidos nucleicos.

Para la obtención de moléculas aisladas de ADN con un alto grado de pureza y poderlas utilizar para la investigación científica, es necesario llevar a cabo solo el primer paso fijado en el método de referencia para la detección de *Salmonella* (método EN/ISO 6579). Consiste en un preenriquecimiento en medio no selectivo (Agua de peptona tamponada) a una temperatura de 37°C durante 24 h.

En cuanto a los métodos de extracción, la mayoría de ellos se basan en la lisis o ruptura de la célula, para posteriormente separar las moléculas de ADN del resto de componentes de la célula. A la hora de seleccionar el método, se debe tener en cuenta varios factores tales como: la cantidad de muestra de la que se dispone para extraer ADN, el tipo de muestra de la que se parte, el grado de pureza que se desea conseguir, el tiempo y costo que requiere cada método previsto del ADN extraído.

Por otro lado, el equipo en el que tiene lugar esta reacción PCR recibe el nombre de termociclador. Las etapas del proceso de amplificación son:

1. Desnaturalización.
2. Hibridación.
3. Elongación.

Estas tres etapas se repiten en un número de ciclos comprendido entre 20-45.

La desnaturalización consiste en la separación de la doble hebra de ADN. Para ello, se aplica un binomio de temperatura/tiempo de 94-96°C/ 0,5-1 minutos. Una vez desnaturalizada la molécula de ADN, se produce una reducción de la temperatura a aproximadamente 45-65°C de modo que se lleve a cabo la hibridación o *annealing*, que consiste en la unión de los *primers* (directo y reverso) en el extremo 3' del ADN molde. Por último, la etapa de elongación en la que se produce la síntesis de una nueva cadena de ADN complementaria a la molécula molde, a partir del extremo 3' de la hebra molde,

utilizando como sustratos los dNTP's. Esta etapa tiene lugar a una temperatura de 60°C debido a que es la temperatura óptima a la que la Taq polimerasa presenta una mayor actividad enzimática (Serrato et al, 2007).

Finalmente, los productos resultantes de la amplificación, denominados amplicones, se someten a un proceso de electroforesis en gel de agarosa para visualizar el producto amplificado, obteniéndose un resultado cualitativo del ensayo (Montalvo y Lugo, 2016).

Sin embargo, la técnica de PCR para la detección de patógenos en los alimentos presenta una serie de limitaciones, debido a la presencia de inhibidores presentes en los medios de enriquecimiento o en los propios alimentos, como proteínas o grasas, los cuales dificultan la amplificación. Por otro lado, esta técnica permite la amplificación de ADN, presente tanto en células viables como en células muertas, dando lugar a falsos positivos. Para solucionar este problema se debe realizar la transcripción inversa del ARN a ADN complementario (ADNc), y posteriormente, se realiza su amplificación mediante PCR.

La técnica PCR se ha mejorado, derivando en la técnica PCR a tiempo real, cuyo fundamento radica en la existencia de una correlación entre la señal de fluorescencia emitida durante el proceso de la PCR y la cantidad de ADN molde (diana para esa PCR). Existen distintos métodos matemáticos que transforman esa señal de fluorescencia en datos de cuantificación absoluta o relativa del fragmento de ADN amplificado. Con esta técnica es posible tanto la identificación de un microorganismo como su cuantificación (Sánchez, 2012).

La detección de fluorescencia emitida por cada muestra puede realizarse mediante la utilización de agentes intercalantes o sondas de hibridación específicas. Dentro de los agentes intercalantes, el más habitual es el fluoróforo SYBR Green, el cual solo emite fluorescencia cuando se encuentra unido a una molécula de ADN de doble cadena, llegando a multiplicar hasta 1000 veces su fluorescencia en comparación a cuando se encuentra libre ya que, estas moléculas, cuando no se encuentran ligadas a una molécula de ADN, emiten fluorescencia basal (Tamay de Dios et al., 2016). Sin embargo, este tipo de compuestos no son muy específicos, por lo que pueden unirse a otras moléculas de ADN no diana y dar una intensidad de fluorescencia errónea, lo que requiere una optimización de las condiciones de amplificación. Pese a ello, SYBR Green es uno de los fluoróforos más utilizados debido a su bajo coste.

Por el contrario, las sondas de hibridación son más costosas que los anteriores, pero no presentan problemas de especificidad, ya que son más eficientes a la hora de garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos. Esto es gracias a que la emisión de

fluorescencia se debe a un principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente”, el cual consiste en transferir la energía desde un donador a un aceptor o “quencher” (Tamay de Dios et al., 2016). Entre estas, las más utilizadas son las sondas TaqMan. La emisión de fluorescencia de las sondas TaqMan se basa en la actividad exonucleasa 5´- 3´del Taq DNA polimerasa, como se muestra en la figura 1, para escindir un oligonucleótido de ADN con doble marca, de modo que la sonda se une en una zona específica que se encuentra en el amplicón de la PCR situado muy próximo a la zona de unión de los cebadores. De este modo la escisión de la sonda da como resultado un aumento de la fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN molde presente. (Dooley et al, 2004).

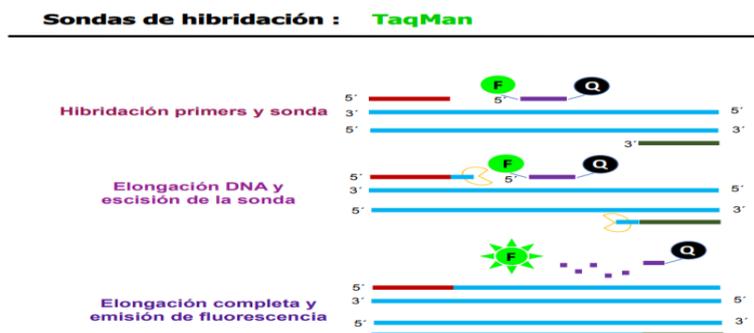


Figura 1. Efecto de las sondas TaqMan sobre la molécula de ADN.

Para poder detectar la fluorescencia emitida, los termocicladores empleados para llevar a cabo la PCR en tiempo real incluyen un lector de fluorescencia, lo que permite la cuantificación a tiempo real. Además, el termociclador incorpora un software que registra la fluorescencia emitida en cada uno de los viales y tras cada ciclo de hibridación/elongación se genera una gráfica donde se representa la cinética de la reacción de cada una de las muestras y controles empleados. (Costa, 2004).

El lector de fluorescencia es capaz de marcar el ciclo a partir del cual el nivel de emisión de fluorescencia es significativo, con respecto a la señal base. Este ciclo se denomina ciclo umbral (Ct, Cycle threshold o Cq, Quantification cycle) y es inversamente proporcional a la concentración de ADN diana presente en la muestra analizada. El valor Ct equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia (Martín et al., 2016).

Las gráficas que representan la cinética de la reacción presentan tres fases (figura 2):

- 1) Fase inicial.
- 2) Fase exponencial.
- 3) Fase estacionaria.

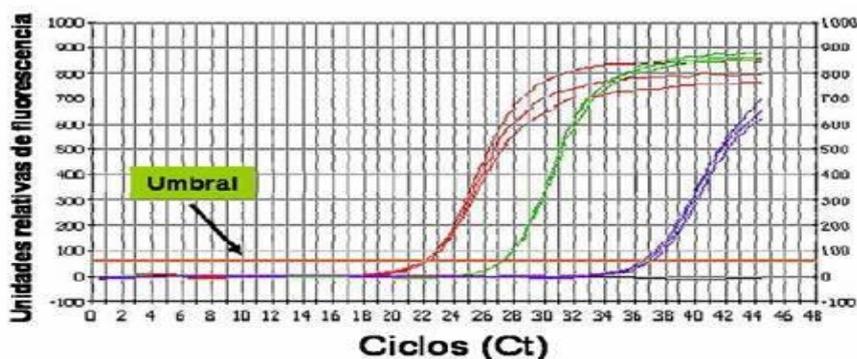


Figura 2. Curva de amplificación donde se muestra la fluorescencia emitida en cada ciclo, y el ciclo umbral.

La fase inicial comprende los primeros 10-15 ciclos donde la intensidad de la fluorescencia emitida no es suficientemente para poder superar el ruido basal. En la fase exponencial, se duplican las moléculas de ADN molde en cada uno de los ciclos, de manera exponencial. Y, por último, la fase estacionaria, en la que el número de amplicones es constante a pesar de incrementar los ciclos, ya que los componentes de la reacción se han agotado (Martín et al., 2016).

Por todo ello, la técnica de PCR a tiempo real nos aporta una serie de ventajas respecto a otras técnicas de detección y cuantificación, tal como la rapidez con la que obtenemos resultados, pues la duración de la técnica oscila períodos de tiempo inferiores a los 90 minutos. Al ser un sistema cerrado y no requerir tratamiento post amplificación, reduce la posibilidad de contaminación de las muestras, reduciéndose los falsos positivos; además de ser una técnica sencilla y de elevada precisión.

Tanto la PCR convencional como la PCR a tiempo real permiten detectar ARN mediante una incorporación de una etapa inicial denominada transcripción inversa, donde la enzima transcriptasa inversa, es capaz de convertir el ADN complementario en ARN.

Una de las limitaciones de la técnica PCR a tiempo real es la necesidad de patrones o estándares para poder desarrollar las curvas estándar para la cuantificación del ADN molde.

La utilización de esta técnica en la industria alimentaria como alternativa a los métodos de referencia requiere de una validación previa por un organismo de certificación. En la actualidad se comercializan diferentes kits PCR a tiempo real para la detección de patógenos alimentarios, concretamente el kit *IQ-Check Salmonella spp. II* (Bio-Rad), que ha sido acreditado por varios organismos, entre ellos AFNOR (Asociación Francesa de Normalización) aportando resultados en un menor período de tiempo que el de referencia ISO (*International Organization for Standardization*). Otra alternativa comercial para la detección de este patógeno validada por AFNOR, es el sistema BAX DuPont Qualicon basado en la PCR.

En este sentido, la empresa Certest Biotec está impulsando la aplicación de kits PCR a tiempo real desarrollados para diagnóstico humano de salmonelosis al campo de la alimentación. Para ello, a través de este Trabajo de Fin de Grado, se estudiará su potencial aplicación y viabilidad en la detección de *Salmonella* spp. en matrices alimentarias.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La necesidad de la industria alimentaria de disponer métodos de análisis rápidos y fiables para detectar *Salmonella* spp. en los alimentos, con el fin de garantizar la seguridad de los alimentos que producen, junto el interés de una empresa de Biotecnología dedicada al desarrollo de procedimientos rápidos de detección de patógenos de interés en salud pública, aplicados en muestras humanas, ha impulsado la realización de este Trabajo Fin de Grado

El objetivo general de este trabajo es la evaluación del kit *Viasure Real Time PCR Detection Kit* de detección molecular de *Salmonella* spp., desarrollado para el diagnóstico de salmonelosis en muestras humanas, para su potencial aplicación en el sistema de autocontrol de la industria alimentaria.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Comparar el kit comercial *Viasure Real Time PCR Detection Kit* para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos frente a un método molecular validado por AFNOR.
- Evaluar diferentes métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de una matriz alimentaria contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de *Salmonella* Enteritidis.
- Proponer un método de extracción de ácidos nucleicos eficaz para su posterior amplificación con el kit *Viasure Real Time PCR Detection Kit* para la detección de *Salmonella* spp. a partir de derivados cárnicos.

3. METODOLOGÍA

3.1. CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS MUESTRAS

3.1.1. Matriz alimentaria

Se partió de un envase de 500 g de burger meat de pollo-pavo (figura 3), y se pesaron 2 muestras de 25 gramos de alimento en bolsas estériles de stomacher en condiciones asépticas. Posteriormente, se añadieron a cada una de las muestras 225 mL de agua de peptona tamponada, se homogeneizaron en un stomacher (STOMACHER® 400 CIRCULATOR) e incubaron a 37°C /24h.

Una de las muestras de alimento pre-enriquecido se contaminó experimental con *Salmonella* Enteritidis CECT 4155 (detallado en el punto 3.1.3.). La otra muestra se utilizó como control, para comprobar la no detección del patógeno en el alimento objeto de estudio.



Figura 3. Muestra de Burger Meat pollo/pavo

3.1.2. Revivificación y concentración bacteriana

La cepa *Salmonella* Enteritidis CECT 4155 se mantuvo en crioviales a -80°C y fue revivificada antes de su utilización en el estudio. Del criovial se pasó un anillo poroso impregnado con el microorganismo a caldo de cultivo TSB (Caldo Triptono-Soja) y se incubó a 37°C/24 horas. A partir del caldo de cultivo TSB, se realizaron un total de 8 diluciones decimales en agua de peptona tamponada, partiendo de 2 mL del caldo de cultivo TSB a 18 mL de agua de peptona tamponada hasta obtener la dilución -8. A partir de las diluciones -6, -7 y -8, se realizó una siembra en masa utilizando el medio TSA (Agar Triptono-Soja). Finalmente, estas tres placas se incubaron a 37°C/24h y se procedió a realizar el recuento de colonias de cada una de ellas con el fin de conocer la concentración inicial y en cada una de las diluciones realizadas. Dichas concentraciones fueron: $7,4 \times 10^8$ ufc/mL, $7,4 \times 10^7$ ufc/mL, $7,4 \times 10^6$ ufc/mL, $7,4 \times 10^5$ ufc/mL, $7,4 \times 10^4$ ufc/mL, $7,4 \times 10^3$ ufc/mL, $7,4 \times 10^2$ ufc/mL, $7,4 \times 10$ ufc/mL y $7,4$ ufc/mL

3.1.3. Contaminación experimental

De cada una de estas concentraciones de *S. Enteritidis* se procedió a contaminar la matriz previamente pre-enriquecida.

A partir del pre-enriquecimiento se prepararon alícuotas de 18 mL, cada una en tubos estériles (sextuplicado) y se transfirieron 2 mL de las diluciones -1, -2, -3, -4, -5 y -6, realizando la dilución 1/10 de cada una de ellas. De este modo las concentraciones de estudio fueron las siguientes: $7,4 \times 10^6$ ufc/mL, $7,4 \times 10^5$ ufc/mL, $7,4 \times 10^4$ ufc/mL, $7,4 \times 10^3$ ufc/mL, $7,4 \times 10^2$ ufc/mL y $7,4 \times 10$ ufc/mL, que equivalen a un rango de 6,87 a 1,87 log ufc/mL.

3.1.3. Extracción de ADN

Para llevar a cabo la comparación de los dos métodos moleculares: *VIASURE Salmonella Real Time PCR Detection kit* e *IQ-Check Salmonella II* de Bio-rad, se llevó a cabo la extracción de ADN con el método de extracción *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction* (método E) y método de extracción del kit IQ-Check, respectivamente. Para ello se procedió a la extracción de ácidos nucleicos desde la dilución -1 ($7,4 \times 10^6$ ufc/mL) hasta la dilución -6 ($7,4 \times 10$ ufc/mL) por duplicado, analizando un total de 24 muestras.

Posteriormente, para evaluar cada uno de los cinco métodos de extracción (método A, método B, método C, método D y método E), se analizaron los valores Ct para aquellas réplicas que amplificaron en cada una de las concentraciones de estudio. Al igual que para la comparativa del método de VIASURE frente al IQ-Check, se ensayó desde la dilución -1 ($7,4 \times 10^6$ ufc/mL) hasta la dilución -6 ($7,4 \times 10$ ufc/mL) por duplicado, obteniendo un total de 60 muestras.

3.1.4. Metodología aplicada para comparar los kits PCR y los métodos de extracción

Para comparar inicialmente cada una de las técnicas de PCR, así como los métodos de extracción, se analizaron los valores Ct de cada una de las diluciones analizadas. Posteriormente, se estableció como límite de detección (LOD) del método aquella concentración correspondiente a la muestra más diluida que mostrase amplificación para las dos réplicas.

Dicha concentración corresponde a 100 μ L de material de partida empleado para la extracción, por lo que se aplicó la siguiente fórmula para calcular la concentración final:

$$\text{Concentración final} = X \text{ ufc/mL} \times 10^{-1}$$

Además, para cada uno de los métodos de extracción se calcularon las eficiencias de la reacción de amplificación y pendiente de la recta a partir de la curva estándar.

Para el cálculo de la eficiencia se aplicó la siguiente fórmula, a partir de la pendiente de la curva estándar:

$$E(\%) = \left[\left(10^{\frac{-1}{pendiente}} \right) - 1 \right] \times 100$$

Se consideran aceptables los valores de eficiencia comprendidos entre el 80 y el 120% (Broeders et al., 2014).

Por otro lado, se obtuvo el coeficiente de determinación (R^2), el cual es un parámetro estadístico que examina cómo las diferencias en una variable pueden explicarse por la diferencia en la segunda variable, prediciendo el resultado de un evento en particular. Por lo tanto, un buen coeficiente de determinación es mejor cuanto más próximo se encuentra a la unidad.

A continuación, se detalla la metodología y el fundamento de los métodos PCR a tiempo real (apartado 3.2) y de cada uno de los métodos de extracción realizados en este estudio (apartado 3.3).

3.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP.

3.2.1. MÉTODO: *Viasure Salmonella Real Time PCR Detection Kit*

FUNDAMENTO

Viasure Salmonella Real Time PCR Detection Kit está diseñado para llevar a cabo la identificación de *Salmonella*, una vez se ha producido el aislamiento del ADN, mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *InvA*.

El proceso de amplificación del ADN se lleva a cabo mediante la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de ADN complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Al producirse esta separación, se genera un incremento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de ADN diana.

Este kit aporta en cada uno de los pocillos todos los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción. Estos componentes son los cebadores/sondas específicas, los dNTPs, el tampón y la DNA-polimerasa. También incluye un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Para llevar a cabo la lectura de la amplificación, el control interno se detecta mediante el canal HEX y *Salmonella* mediante el canal FAM.

PROTOCOLO

Antes de comenzar con la amplificación, se debe reconstituir el vial de *Salmonella Positive Control* liofilizado añadiendo 100 µL de agua libre de RNAsa/DNAsa suministrada en el kit. Se debe asegurar que se homogeneiza correctamente con la ayuda de un vortex.

Posteriormente se han de reconstituir el número de pocillos a utilizar (muestras, control positivo + control negativo) añadiendo 15 µL del *Rehydration Buffer* en cada uno de ellos. En el caso de los eluidos mediante el kit *Viasure Resp. viruses quick lysis reagent* y *Viasure quick lysis reagent* optimizado, se empleó un *buffer* específico proporcionado con los reactivos de extracción de cada uno de los kits comerciales.

En el caso del *Viasure Resp. viruses quick lysis reagent*, se añadirán 12 µL del *Rehydration Buffer Lysis Reagent*.

En último lugar, se deben de añadir 5 µL de las muestras de ADN extraído con anterioridad de cada uno de los métodos de extracción, así como 5 µL de *Salmonella Positive Control* reconstituido y *Negative Control* en su pocillo correspondiente. Asegurarse de que todos los componentes se mezclan de forma adecuada mediante una centrifugación de 5 segundos.

En el caso del *Viasure Resp. viruses quick lysis reagent*, se añadirán 8 µL de muestra.

Por último, hay que configurar el termociclador siguiendo las condiciones mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de tiempo y temperatura necesarios para llevar a cabo la amplificación con el método *Viasure Salmonella Real Time PCR Detection*.

CICLOS	ETAPA	TIEMPO	TEMPERATURA
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
45	Hibridación/Elongación	50 seg	60°C

Para la interpretación de los resultados, una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40, siendo este ciclo el límite del método. Por el contrario, una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. Por último, una muestra se considera inválida si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo.

3.2.2. MÉTODO: IQ-Check Salmonella II

FUNDAMENTO

El kit *IQ-Check Salmonella spp. II* consiste en la amplificación y detección de genes por PCR a tiempo real. Para ello, las muestras se someten a varios ciclos de calentamiento y enfriamiento de modo que se favorezca la desnaturalización de la doble hebra que conforman la molécula de ADN, seguido de una hibridación de los cebadores a la región diana. El kit aporta todos los compuestos necesarios para que lleve a cabo la amplificación y detección, aportando oligonucleótidos específicos para *Salmonella* spp., así como la enzima ADN polimerasa y nucleótidos.

Este método de detección incorpora un método de extracción de ácidos nucleicos específico basado en una lisis rápida de la muestra alimentaria.

PROTOCOLO

El kit *IQ-Check* aporta los compuestos necesarios para llevar a cabo la lisis y amplificación y detección de ADN.

Para la extracción de los ácidos nucleicos el procedimiento es el siguiente:

- 1) Añadir a 100 µL de muestra pre-enriquecida, 100 µL del reactivo de lisis. Asegurarse de que se homogeneiza la mezcla correctamente aplicando durante 2 minutos agitación.
- 2) Incubar a 95-100°C durante 10-15 minutos.
- 3) Centrifugar los eppendorf a 10000-12000 rpm durante al menos 2 minutos.

Una vez el ADN es lisado, el protocolo para la amplificación y detección es el siguiente:

- 1) Preparar la mix de PCR. Este mix contiene la solución de amplificación que incluye todos los componentes necesarios para que se lleve a cabo (reactivo B) y las sondas fluorescentes (reactivo C). Para preparar la mix es necesario consultar los volúmenes necesarios de cada reactivo en base al número de muestras que se van a analizar. Esta información está incluida en el apéndice de las instrucciones de uso.
- 2) Una vez preparada la mix, transferir 45 µL a cada pocillo.
- 3) Añadir 5 µL de muestra a cada uno de los pocillos, así como el control positivo y control negativo a los pocillos correspondientes. Es importante centrifugar después de añadir la muestra para evitar la formación de burbujas en el fondo. Aplicar las tiras en el bloque térmico del termociclador y comenzar la amplificación.

3.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:

3.3.1. MÉTODO A: *Viasure RNA/DNA*

FUNDAMENTO

El fundamento de este método de extracción consiste en aislar el ADN/ARN mediante la interacción de los ácidos nucleicos con partículas de sílica incluidas en la membrana de las columnas bajo unas condiciones óptimas de pH y fuerza iónica.

La primera fase consiste en producir una lisis celular a través de un buffer de lisis y *proteinase K*, de modo que se lleva a cabo la ruptura de la pared celular, liberando así el ADN/ARN. La segunda fase se basa en la incorporación de isopropanol, cuyo objetivo es crear las condiciones óptimas necesarias para que se produzca la unión de los ácidos nucleicos a las columnas de sílica. Para producir la eliminación de posibles contaminantes se aplican tres fases de lavado con diferentes buffers. Una vez aplicados los buffers de lavado, se eluye de forma específica, mediante un buffer de elución, el ADN que se encuentra ligado a las columnas de sílica, de forma que se separen de éstas, y se obtenga la muestra que va a ser destinada a la amplificación de forma directa. Si el análisis mediante PCR no se va a realizar en el momento, es necesario conservar la muestra en condiciones de congelación a una temperatura entre -20 °C/-80 °C.

PROTOCOLO

Antes de empezar se ha reconstituir el vial de *Proteinase K* añadiendo 1.1 mL de RNase *free Water* y mezclarlo mediante agitación. A su vez, también hay que reconstituir los buffers de lavado añadiendo 20 mL de isopropanol a 99.7% al *Wash I* y 42 mL de etanol al 99.8% al *Wash II*.

El proceso de extracción se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante (Certest Biotec):

- 1) Añadir a los 200 µL de muestra (constituida por 100 µL de la muestra de burger meat contaminada + 100 µL de agua de peptona tamponada) 200 µL del *Lysis Buffer* y 20 µL de *Proteinase K*, asegurando que se mezcla correctamente aplicando durante 5 segundos agitación mediante un vortex para posteriormente incubar las muestras a 65°C durante 10 minutos.
- 2) Añadir 260 µL del *Binding Buffer* y de nuevo se agita durante 5 segundos con ayuda de un vortex y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3) Transferir toda la muestra al set de columnas denominado *Mini Spin Column set*. Una vez transferido, centrifugar los viales 1 minuto a 11000 revoluciones por minuto (rpm), para descartar seguidamente el eluido, conservando la columna.

- 4) Introducir la columna en un nuevo eppendorf y añadir 600 µL del *Wash Buffer I* en el interior de la columna. Volver a centrifugar 1 minuto a 11000 rpm y descartar el eluido de nuevo, conservando la columna.
- 5) Introducir la columna en un nuevo eppendorf y añadir 700 µL de *Wash Buffer II* en el interior de la columna. Centrifugar de nuevo 1 minuto a 11000 rpm y descartar el eluido, conservando la columna.
- 6) Repetir el paso 5, pero esta vez centrifugando durante 5 minutos a 11000 rpm.
- 7) Por último, añadir 100 µL de *Elution Buffer* (previamente precalentado a 65°C), e incubar los viales durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras la incubación, centrifugar durante 1 minuto a 11000 rpm y descartar la columna, conservando el eluido que se encuentra en el eppendorf, ya que contiene el ADN extraído.
- 8) Finalmente, el ADN extraído se utiliza al momento o conservarlo en condiciones de congelación a una temperatura de -20°C/-80°C.

3.3.2. MÉTODO B: *Viasure Resp. Viruses Quick Lysis Reagent*

FUNDAMENTO

Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent es un kit de lisis diseñado para el tratamiento rápido de muestras y su posterior análisis mediante los kits comerciales *VIASURE Real Time PCR Detection* dirigidos a la detección de virus respiratorios.

El método se basa en la lisis de partículas virales, con la ayuda de una enzima proteolítica y tratamiento a alta temperatura, y en la separación de compuestos que pueden interferir con la reacción PCR a tiempo real, utilizando resinas y sedimentación.

PROTOCOLO

Este kit consta de las siguientes etapas:

- 1) Reconstituir el *Resp. viruses Lysis Reagent* liofilizado añadiendo 185 µL del *Rehydration Buffer* suministrado por el kit.
- 2) Añadir 200 µL de muestra (100 µL muestra de burger meat contaminada + 100 µL de agua de peptona tamponada) en el *Resp. viruses Lysis Reagent* previamente reconstituido.
- 3) Vortear la solución durante 5 segundos.
- 4) Incubar la mezcla durante 10 minutos a 100°C.
- 5) Vortear de nuevo la muestra.

- 6) Reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente, para que se produzca la sedimentación de los sólidos que puedan interferir en la PCR a tiempo real.
- 7) Transferir 50 µL del sobrenadante a un nuevo eppendorf.
- 8) Finalmente, el ADN extraído se utiliza al momento o conservarlo en condiciones de congelación a una temperatura de -20°C/-80°C.

3.3.3. MÉTODO C: *Viasure Quick Lysis Reagent* Optimizado

FUNDAMENTO

Este método de extracción es una optimización del método *Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent* para ser empleado con muestras alimentarias para la detección de patógenos ADN.

PROTOCOLO

El procedimiento de *Viasure quick lysis reagent* optimizado consta de las siguientes etapas:

- 1) Reconstituir el *Lysis Reagent* optimizado liofilizado añadiendo 100 µL del *Rehydration Buffer* suministrado por el kit.
- 2) Añadir 100 µL de muestra contaminada en el *Lysis Reagent* previamente reconstituido.
- 3) Vortear la solución durante 5 segundos.
- 4) Incubar la mezcla durante 10 minutos a 100°C.
- 5) Volver a vortear durante un periodo de 5 segundos la muestra.
- 6) Dejar reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente, para que se produzca la sedimentación de los sólidos que puedan interferir en la PCR a tiempo real.
- 7) Transferir 50 µL del sobrenadante a un nuevo eppendorf.

3.3.4. MÉTODO D: *Nucleomag DX Pathogen Kit*

FUNDAMENTO

El método de extracción *NucleoMag Dx Pathogen Kit* está diseñado para el aislamiento de ADN/ARN viral a partir de muestras respiratorias o saliva. El fundamento del kit se basa en un fenómeno de absorción reversible de los ácidos nucleicos por parte de partículas magnéticas bajo unas condiciones del medio apropiadas.

Las etapas que rigen este método son una primera fase de lisis, producida a partir de un *Lysis Buffer*, junto con la adición de *Proteinase K*, de modo que se produzca una ruptura de la pared celular que permita la liberación del material genético. Una segunda fase que consiste en la unión del ADN a las partículas magnéticas. Para ello, se adiciona al material lisado, el *Binding Buffer* y las partículas

magnéticas. En tercer lugar, se produce una separación magnética empleando un imán que facilita las etapas de lavado, siendo éstas tres etapas, dos empleando los buffers de lavado y una tercera con etanol al 80%, de modo que consiga eliminar los contaminantes presentes. Finalmente, el ADN viral puro es eluido tras la adición de un buffer de elución, por lo que los ácidos nucleicos están preparados para amplificar, o ser conservados en congelación a $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$.

PROTOCOLO

El procedimiento de *NucleoMag Dx Pathogen Kit* consta de las siguientes etapas:

- 1) Añadir a los 200 μL de muestra (100 μL muestra de burger meat contaminada + 100 μL agua de peptona tamponada) 180 μL de *Lysis Buffer* y 20 μL de *Proteinase K* para producir la lisis. Mezclar todos los componentes de forma adecuada e incubar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de 15 minutos.
- 2) Tras la incubación, adicionar 20 μL de las partículas magnéticas y 600 μL del *Binding Buffer*. Homogeneizar correctamente y aplicar imán durante 2 minutos. Pasado este tiempo, eliminar el sobrenadante y separar los eppendorf del imán.
- 3) Añadir 600 μL del *Wash Buffer I* para aplicar el primer lavado, asegurando que se homogeneiza correctamente. Aplicar de nuevo el imán y dejar reposar durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante y separar los eppendorf del imán.
- 4) Añadir 600 μL del *Wash Buffer II* para aplicar el segundo lavado, asegurando que la mezcla se homogeneiza de forma adecuada. Aplicar de nuevo el imán y dejar reposar durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante y separar los eppendorf del imán.
- 5) Añadir 600 μL de etanol 80% para aplicar el tercer lavado, asegurando que se homogeneiza correctamente. Aplicar de nuevo el imán y dejar reposar durante 2 minutos. Pasado este tiempo, eliminar el sobrenadante.
- 6) Dejar secar las partículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Finalmente, añadir 100 μL del *Elution Buffer*, homogeneizando bien la mezcla con ayuda del vortex. Volver a aplicar el imán y dejar que se separen durante 2 minutos. Pasado este tiempo, transferir el sobrenadante de la muestra eluida a un nuevo eppendorf.
- 8) Una vez el DNA extraído, utilizar directamente o conservar en congelación a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$.

3.3.5. MÉTODO E: *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction Kit*

FUNDAMENTO

Este método está basado en la absorción espontánea y reversible de ácidos nucleicos a la superficie de partículas superparamagnéticas bajo una serie de condiciones del medio optimizadas.

En primer lugar, se produce una lisis y la absorción de los ácidos nucleicos a través de las partículas paramagnéticas. Después, las partículas son atraídas por la fuerza de atracción aplicada mediante un imán de modo que se separen los ácidos nucleicos del resto de sustancias que pueda. Tras varios pasos de lavado, cuyo objetivo es eliminar restos celulares y sales, las partículas son secadas al aire para eliminar residuos solventes orgánicos. Finalmente, el ADN es separado de las partículas magnéticas mediante un buffer de elución, de forma que se obtiene una solución pura y concentrada de ácidos nucleicos.

PROTOCOLO

El procedimiento del *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction Kit* está marcado por las siguientes etapas:

- 1) Añadir 100 μL de muestra inicial más 100 μL de agua de peptona tamponada en un tubo Eppendorf.
- 2) Añadir 265 μL de *Lysis Buffer* y 15 μL de *Proteinase K*. Una vez añadido, incubar los pocillos durante 5/10 minutos a una temperatura de 70°C.
- 3) Tras la incubación, añadir 200 μL de isopropanol y 15 μL de partículas magnéticas. Aplicar el imán para que las partículas magnéticas, las cuales se encuentran adheridas a los ácidos nucleicos, se separen. Dejar reposar durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
- 4) Retirar los pocillos del imán y aplicar 500 μL del *Wash Buffer I*. Asegurar que se mezcle correctamente con ayuda del vortex. Aplicar el imán y dejar reposar durante 10 minutos. Eliminar el *Wash Buffer I*.
- 5) Retirar de nuevo los tubos Eppendorf del imán y aplicar 500 μL del *Wash Buffer II*. Homogeneizar la mezcla con ayuda del vortex. Aplicar el imán y dejar reposar durante 10 minutos. Eliminar el *Wash Buffer II*.
- 6) Secar las partículas a una temperatura de 55°C 3-5 minutos.
- 7) Finalmente, añadir 100 μL del *Elution Buffer* y dejar reposar durante 5 minutos a 45°C. A continuación, aplicar el imán y transferir el eluido a un nuevo tubo Eppendorf.
- 8) Utilizar el ADN extraído directamente o conservarlo en congelación a una temperatura de -20°C/-80°C.

4-. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comparación del método *Viasure Salmonella Real Time PCR Detection Kit* frente al método validado *IQ- Check Salmonella II* en muestras de alimentos.

Para evaluar la sensibilidad, tanto del método *IQ-Check Salmonella II* de Bio-rad, como del método *Viasure Real Time PCR Detection* de Certest Biotec, se emplearon los ácidos nucleicos obtenidos a partir de las muestras de burger meat que presentaban las siguientes concentraciones de *Salmonella* Enteritidis: $7,4 \times 10^6$ ufc/mL, $7,4 \times 10^5$ ufc/mL, $7,4 \times 10^4$ ufc/mL, $7,4 \times 10^3$ ufc/mL, $7,4 \times 10^2$ ufc/mL y $7,4 \times 10$ ufc/mL, que equivalen a un rango de 6,87 a 1,87 log ufc/mL. Los resultados de ambos métodos se muestran en la tabla 4.

Como se ha citado en el apartado 3.1.3. (metodología), los resultados utilizados para el método *Viasure Real Time PCR Detection* de Certest Biotec fueron los obtenidos mediante el empleo del método de extracción *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction* (método E).

En la tabla 4 se observa la concentración de *Salmonella* en log ufc/mL, ufc sometidas a extracción, el número de muestras positivas respecto a las evaluadas (ratio) y la media del valor Ct y su desviación estándar para cada una de las muestras objeto de estudio empleando los dos kits de amplificación, *IQ-Check Salmonella II* y *Viasure Real Time PCR Detection*.

Tabla 4. Valores medios de Ct y desviación estándar (DS) para cada dilución, número de muestras positivas respecto a las evaluadas (ratio) y concentración de *Salmonella* spp. expresada en log ufc para el método *IQ-Check Salmonella II* y *Viasure Salmonella Real Time PCR Detection Kit*, empleando como método de extracción el método *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction* (método E).

CONCENTRACIÓN DE SALMONELLA (log ufc/mL) (ufc/extracción)	<i>IQ-CHECK</i> Ct ± DS	<i>VIASURE REAL TIME PCR</i> (EXTRACCIÓN MÉTODO E) Ct ± DS
	RATIO	RATIO
6,87	30,08 ± 0,26	27,48 ± 0,95
$7,4 \times 10^5$ ufc	2/2	2/2
5,87	34,35 ± 0,02	30,00 ± 0,27
$7,4 \times 10^4$ ufc	2/2	2/2
4,87	38,48 ± 1,69	33,23 ± 0,69
$7,4 \times 10^3$ ufc	2/2	2/2

3,87	40,08 ± 0,48	36,89 ± 0,65
7,4 x 10 ² ufc	2/2	2/2
2,87	40,89	39,11
7,4 x 10 ¹ ufc	1/2	1/2
1,87	N/A	N/A
7,4 ufc	0/2	0/2

Método E: *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction Kit*; **N/A**= No Amplifica.

El método *IQ-Check Salmonella II* fue capaz de amplificar todas las réplicas evaluadas hasta la concentración 3,87 log ufc/mL; sin embargo, para la concentración de 2,87 log ufc/mL, amplificó una de las dos diluciones, lo cual puede indicar un fallo analítico en la preparación de la muestra, pero siendo tan elevado el ciclo en el que se produjo la amplificación, seguramente no habría suficiente ADN para amplificar. Por el contrario, ninguna de las muestras con concentración más reducida (1,87 log ufc/mL) mostró amplificación.

Teniendo en cuenta que la cantidad de ADN que se amplifica para todos los métodos es de 100 µL, el LOD (Limit of Detection) para el método *IQ-Check Salmonella II* se establece en una concentración de 7,4 x 10² ufc; si bien, sería conveniente ampliar el número de muestras para un estudio de validación.

Se elaboró la curva estándar a partir de los valores medios de Ct ± SD y las concentraciones de *Salmonella* Entirritidis expresadas en log ufc (figura 4).

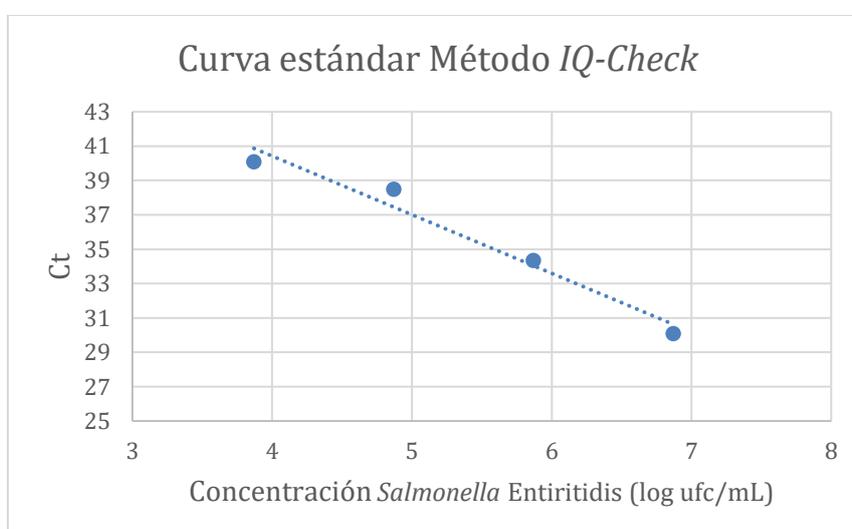


Figura 4. Curva estándar de ADN obtenida de la burger meat contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de *S. Enteritidis* CECT 4155 empleando *IQ-Check Salmonella II*. **Ecuación de la recta:** $y = -3,413x + 54,075$; $R^2 = 0,966$

Como se observa en la figura 4, se obtuvo un coeficiente de determinación muy próximo a la unidad (0,996), y la eficiencia de la reacción fue de un 96,34%, por lo que la reacción de amplificación se considera óptima, ya que se encuentra dentro de los porcentajes adecuados (80% - 120%).

Los resultados obtenidos mediante el workflow método de extracción E + *VIASURE Real Time PCR Detection* seleccionado para realizar la comparativa frente al método validado, se observó que a partir del método *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction*, la concentración más baja (1,87 log ufc/mL) no fue capaz de amplificar ningún replicado, al igual que sucede con el *IQ-Check Salmonella II*. Además, para la concentración de 2,87 log ufc/mL amplificó uno de las dos replicados, obteniéndose un valor de Ct igual a 39,11. Para el resto de las concentraciones, se observó amplificación en todas las muestras. Por ello, el LOD se fijó a una concentración de $7,4 \times 10^2$ ufc.

De la curva estándar (figura 7) elaborada a partir de los valores medios de Ct y la concentración de *Salmonella* Enteritidis (expresada en log ufc/mL), se obtuvo el coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de la recta.

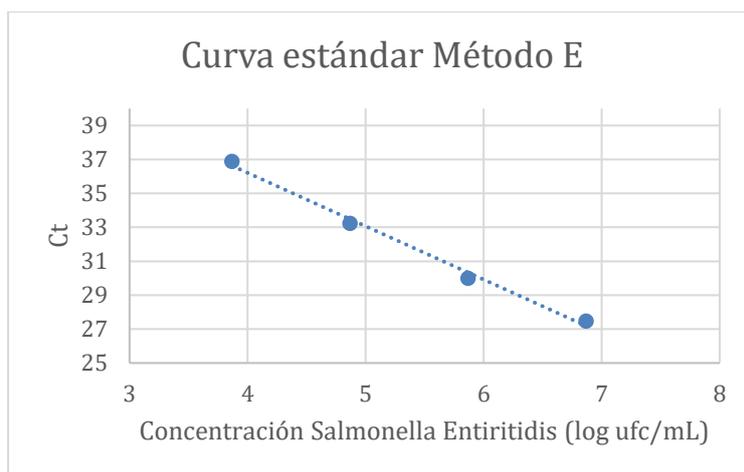


Figura 5. Curva estándar de ADN obtenida de la burger meat contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de *S. Enteritidis* CECT 4155, empleando extracción *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction Kit* (método E). **Ecuación de la recta:** $y = -3,146x + 48,794$; $R^2=0,993$

Como se observa, se obtuvo una buena linealidad, con un coeficiente de determinación de 0,993. Por otro lado, la eficiencia de la reacción (E) obtenida fue del 107,9%, por lo que se considera óptima ya que se encuentra entre el 80%-120% establecido.

Si nos fijamos en los resultados mostrados en la tabla 4, podemos observar que ambos métodos presentan el mismo LOD, fijado a una concentración de $7,4 \times 10^2$ ufc y que ambos métodos han sido capaces de amplificar, al menos en una ocasión, en una concentración menor. Sin embargo, el *kit Viasure Real Time PCR Detection* presentó valores de Ct inferiores para todas las concentraciones ensayadas, lo que puede reflejar que hay una mayor cantidad de ADN diana en las muestras debido al método de extracción empleado, una menor presencia de inhibidores o una mayor calidad del ADN extraído que puede dar lugar a una mayor eficiencia de la reacción de amplificación. Esto probablemente sea debido a que el método E de extracción incluye un paso de purificación mediante el uso de partículas paramagnéticas y *buffer* de lavado. El kit validado *IQ-Check* tan solo incluye un paso inicial de lisis celular previo a la fase de amplificación, lo que se traduce en la obtención de ácido nucleico menos purificado y en consecuencia mayor interferencia en la etapa de amplificación.

Por ello, estos resultados muestran que el *kit Viasure Real Time PCR Detection* proporciona resultados similares e incluso mejores al método validado, obteniendo valores de Ct más tempranos y que por lo tanto es una técnica fiable y rápida para la detección de *Salmonella* spp. en productos cárnicos. Si bien, sería necesario ampliar el número de réplicas para poder llevar a cabo un análisis más completo.

En un estudio realizado en 2021, se analizaron 92 muestras de diferentes alimentos para la detección de *Salmonella* spp. tanto por el método de PCR a tiempo real como por el método convencional. El método PCR a tiempo real presentó una sensibilidad relativa, especificidad y precisión relativas del 100% en comparación al método convencional, demostrando que esta técnica permite obtener los mismos resultados que el método convencional, con la ventaja de obtenerlos en un menor período de tiempo (Damkerng et al, 2021).

4.2. Evaluación de la sensibilidad del *kit Viasure Real Time PCR Detection* de detección de *Salmonella* spp con diferentes métodos de extracción.

Para evaluar la sensibilidad del *kit Viasure Real Time PCR Detection* con cada uno de los métodos de extracción, se emplearon los ácidos nucleicos obtenidos a partir de las muestras de burger meat que presentaban las siguientes concentraciones de *Salmonella* Enteritidis: $7,4 \times 10^6$ ufc/mL, $7,4 \times 10^5$ ufc/mL, $7,4 \times 10^4$ ufc/mL, $7,4 \times 10^3$ ufc/mL, $7,4 \times 10^2$ ufc/mL y $7,4 \times 10$ ufc/mL, que equivalen a un rango de 6,87 a 1,87 log ufc/mL.

En la tabla 5 se observa para cada uno de los métodos de extracción evaluados, la concentración de *Salmonella* en log ufc/mL, ufc sometidas a extracción, el número de muestras positivas respecto a las evaluadas (ratio) y la media del valor Ct y su desviación estándar para cada una de las muestras objeto de estudio:

Tabla 5. Valores medios de Ct y desviación estándar (DS) para cada concentración de *Salmonella* Entititidis expresada en log ufc para el kit *Viasure Real Time PCR Detection* empleando cada uno de los métodos de extracción.

CONCENTRACIÓN DE SALMONELLA (log ufc/mL) (ufc/extracción)	MÉTODO A Ct ± DS	MÉTODO B Ct ± DS	MÉTODO C Ct ± DS	MÉTODO D Ct ± DS	MÉTODO E Ct ± DS
	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO
6,87 7,4 x 10 ⁵ ufc	28,32 ± 0,47	27,87 ± 1,07	24,88 ± 0	26,58 ± 0	27,48 ± 0,95
	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
5,87 7,4 x 10 ⁴ ufc	29,93 ± 0,36	31,05 ± 1,16	27,87 ± 0,52	30,00 ± 0,49	30,00 ± 0,27
	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
4,87 7,4 x 10 ³ ufc	31,90 ± 0,61	36,36 ± 2,78	31,39 ± 0,23	33,77 ± 1,10	33,23 ± 0,69
	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
3,87 7,4 x 10 ² ufc	37,87 ± 2,86	40,14	38,99 ± 0,59	36,58 ± 0,66	36,89 ± 0,65
	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2
2,87 7,4 x 10 ¹ ufc	N/A	N/A	N/A	N/A	39,11
	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
1,87 7,4 ufc	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Método A: *Viasure RNA-DNA*; **Método B:** *Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent*; **Método C:** *Viasure Quick Lysis Reagent Optimizado*; **Método D:** *NucleoMag Dx Pathogen Kit*; **Método E:** *Viasure DNA/RNA Pathogen Extraction Kit*; **N/A=** No Amplifica.

Como podemos observar en la tabla 5, para los 5 métodos empleados, las réplicas de las concentraciones más elevadas (6,87 log ufc/mL, 5,87 log ufc/mL, 4,87 log ufc/mL y 3,87 log ufc/mL) muestran amplificación, con valores de Ct muy similares entre ellos. Sin embargo, se aprecia una excepción para el método B (*Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent*), ya que para la concentración de 3,87 log ufc/mL, solo se observa amplificación en una de las réplicas, además el valor Ct obtenido es muy elevado, cercano al límite (Ct = 40).

Cabe destacar también que, para todos los métodos, se obtienen unos valores de desviación estándar bajos (inferiores a la unidad), lo cual refleja la precisión de la técnica. Sin embargo, para el método B (*Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent*), todas las concentraciones muestran desviaciones

superiores a la unidad. Esto es debido al arrastre de inhibidores que afectan a la reacción de amplificación, lo que refleja que la extracción no ha sido del todo eficiente.

Los resultados obtenidos por el método B, podría deberse a que es un método de extracción diseñado y optimizado para el análisis de virus respiratorios ARN a partir de muestras obtenidas de vías respiratorias altas (torundas nasofaríngeas y saliva), pero no para muestras alimentarias ni bacterias, que, a diferencia de los virus, presentan ADN en su genoma. Además, la matriz alimentaria de este estudio, una burger meat, presenta un alto contenido de grasa, que podrían interferir en la extracción del ADN y por lo tanto dificultar la amplificación de este.

A la vista de los resultados obtenidos, para todos los métodos de extracción a excepción del *Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent* (método B), se establece el LOD de $7,4 \times 10^2$ ufc.

Las curvas estándar elaboradas con los métodos que han mostrados mejores resultados (A, C y D) se muestran en las figuras 6,7 y 8, respectivamente. Para ello, se han utilizado los valores medios de $Ct \pm DS$ y las diferentes concentraciones de *Salmonella* Enteritidis en burger meat en las que ha habido amplificación en las dos réplicas.

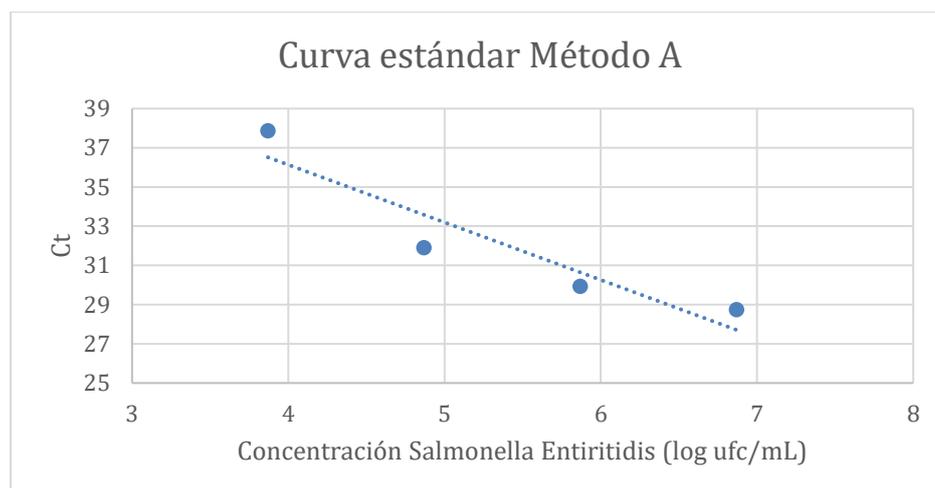


Figura 6. Curva estándar de ADN obtenida de la burger meat contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de *S. Enteritidis* CECT 4155 para el método *Viasure RNA-DNA* (método A).

Ecuación de la recta: $y = -2,936x + 47,876$; $R^2=0,873$

La figura 6, muestra la curva estándar a partir de la cual se ha calculado la eficiencia (E) y el coeficiente de determinación (R^2) para el método A. Se ha obtenido una eficiencia del 119%, siendo un valor dentro de los parámetros establecidos. Sin embargo, el coeficiente de determinación es bajo, lo que podría indicar una correlación lineal escasa.

En segundo lugar, en la figura 7 representa la curva estándar para el método C.

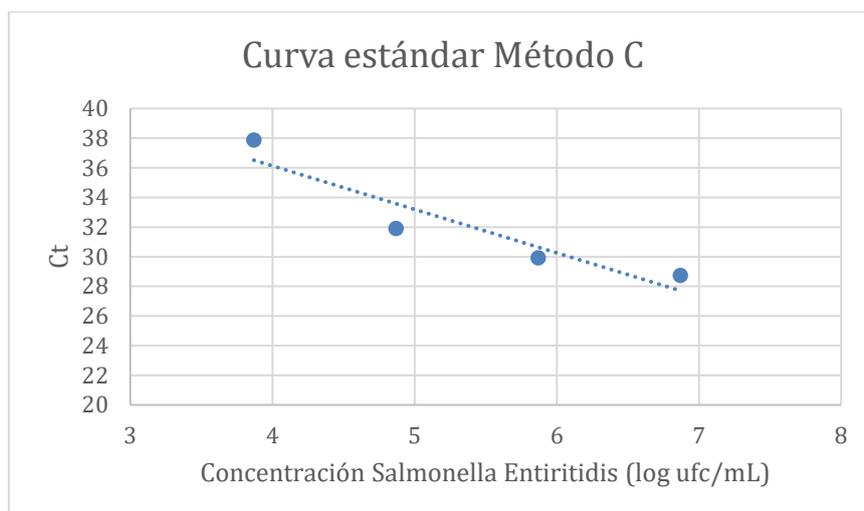


Figura 7. Curva estándar de ADN obtenida de la burger meat contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de *S. Enteritidis* CECT 4155 para el método *Viasure Quick Lysis Reagent* Optimizado (método C). **Ecuación de la recta:** $y = -3,885x + 55,404$; $R^2=0,947$

Se obtuvo una adecuada linealidad, ya que se observó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,947. Además, la eficiencia de la reacción (E) fue de un 81%, por lo que es valor aceptable ya que la eficiencia de la reacción debe encontrarse entre porcentajes del 80% al 120%.

Por último, la figura 8 muestra la curva estándar para el método *NucleoMag Dx Pathogen Kit* (método D).

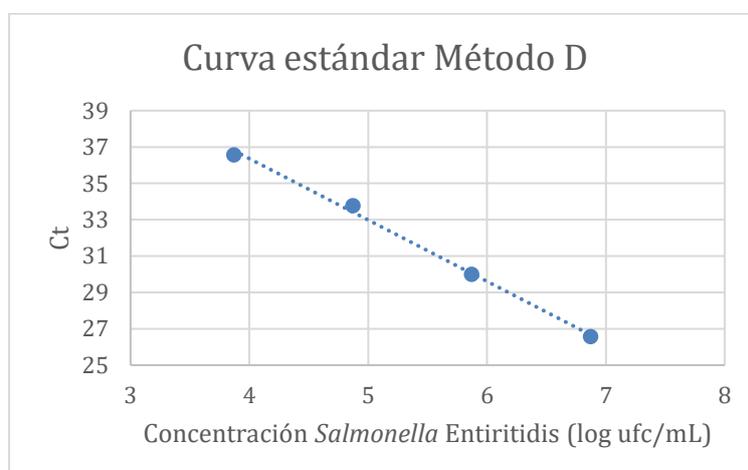


Figura 8. Curva estándar de ADN obtenida de la burger meat contaminada experimentalmente con diferentes concentraciones de *S. enteritidis* CECT 4155 empleando *NucleoMag Dx Pathogen Kit* (método D). **Ecuación de la recta:** $y = -3,595x + 51,069$; $R^2= 0,998$

En cuanto al coeficiente de determinación (R^2), se obtuvo una linealidad cercana a uno (0,998) y la eficiencia de la reacción, calculada a partir de la pendiente de la recta, es de 89%, encontrándose dentro de los parámetros aceptables.

Por lo tanto, los resultados del estudio sugieren que 4 de los 5 métodos de extracción permiten llevar a cabo la amplificación del ADN hasta la concentración de $7,4 \times 10^3$ ufc, que corresponde con $7,4 \times 10^2$ ufc, si bien, el método *DNA/RNA Pathogen Extraction* (método E) fue el único que mostró amplificación en al menos una de las dos réplicas de la concentración inferior ($7,4 \times 10^1$ ufc), por lo que sería necesario un estudio más completo para poder obtener más información. Por el contrario, el kit *Viasure Resp. viruses Quick Lysis Reagent* resultó ser el método menos efectivo, ya que se observó grandes variaciones en los resultados obtenidos para todas las concentraciones. Sin embargo, ese mismo método optimizado para ser empleado con muestras alimentarias (método C) presentó mejores resultados, mostrando amplificación en aquellas muestras que presentaron las concentraciones más elevadas, con valores de Cq más tempranos.

Por otro lado, si comparamos los diferentes métodos de extracción (B, C, D y E) con el método A basado en la purificación de ácidos nucleicos en columnas, como método de referencia de extracción, podemos observar algunas diferencias.

En la figura 9, se representan las rectas obtenidas con los 5 métodos de extracción y el método de amplificación PCR a tiempo real de *Viasure* y en la figura 10, se muestra la comparativa entre el método A y los métodos cuya extracción se basa en la purificación con partículas magnéticas.

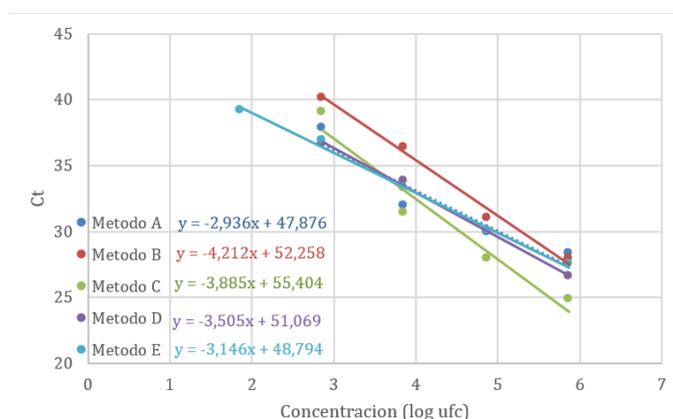


Figura 9. Comparativa de los 5 métodos de extracción

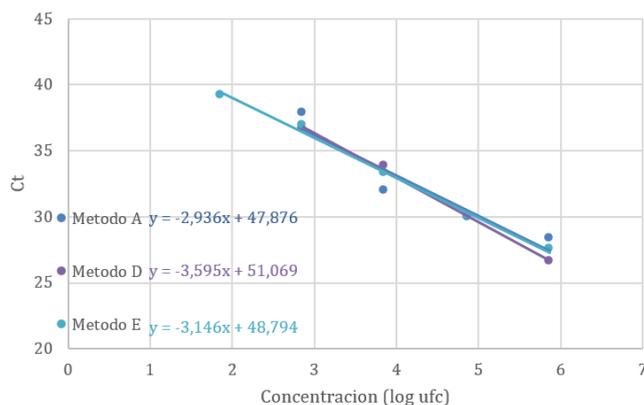


Figura 10. Método A de referencia y los métodos cuya extracción se basa en la purificación con partículas magnéticas.

El método D (NucleoMag) y el E (Viasure) presentan unas rectas solapadas. Estos flujos de detección molecular muestran una eficiencia comparable en términos de purificación de ácidos nucleicos y de amplificación PCR. Si bien es cierto que para bajas concentraciones (altos Ct) se obtienen mejores resultados con el flujo de VIASURE.

En cuanto a los métodos VIASURE de lisis rápida, métodos B y C (figura 11) presentan una pendiente comparable pero desplazada, probablemente por diferente influencia de la matriz alimentaria o lisis de microorganismos entre ambos, ya que en este procedimiento no existen pasos en el protocolo de purificación de ácidos nucleicos. Se puede observar como el método C (optimizado) presenta mejores valores de Ct.

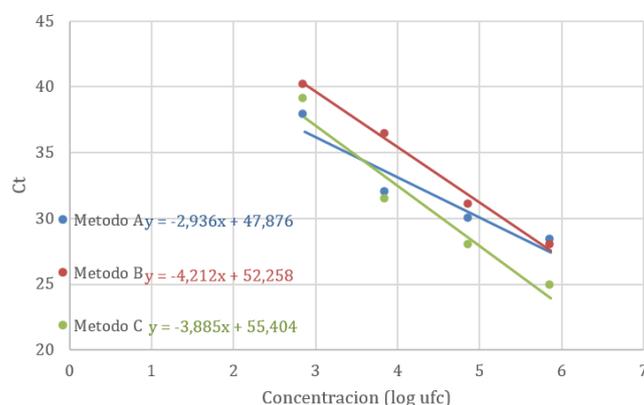


Figura 11. Método A de referencia y los métodos cuya extracción se basa en lisis rápida.

Si comparamos estos métodos de lisis rápida con el método de purificación con columnas (A), podemos observar como el método C (mejorado) presenta, por lo general, mejores valores de Ct a todas las concentraciones, excepto en el caso de la más diluidas, donde los resultados son comparables. Estos resultados son muy interesantes ya que es un procedimiento rápido y sencillo, en

el que no se realiza en ningún momento lavado de restos celulares o compuestos procedentes del alimento, es decir, no realiza purificación de ácidos nucleicos. Sería de gran interés determinar la funcionalidad y eficiencia de este kit con otras matrices alimentarias.

Con este análisis preliminar, podemos observar la eficiencia de diferentes métodos moleculares. Para obtener una idea más clara sobre el comportamiento de todos los flujos, sería interesante ampliar el número de réplicas en la linealidad, así como en la determinación del límite de detección.

Por otro lado, sería interesante comparar la eficiencia de amplificación PCR de ambos kits con el flujo completo de extracción + PCR, y así determinar cuál de todos se ve más influenciado por la matriz alimentaria. Una adecuada purificación permitiría, presumiblemente, la detección de los microorganismos de interés de un abanico mayor de matrices alimentarias. También sería interesante realizar contaminaciones experimentales sobre otras matrices alimentarias diferentes a la de este trabajo.

5-. CONCLUSIONES

1.- Los resultados obtenidos evidencian la ventaja del análisis molecular por PCR a tiempo real para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos, obteniendo los resultados en un menor período de tiempo que el método convencional fijado en la legislación.

2.- El *Kit comercial Viasure Real Time PCR Detection* de detección de *Salmonella* spp., ha mostrado que presenta una sensibilidad similar al método validado con el que se ha comparado por lo que podría optar a ser validado con el fin de poder ser aplicado como sistema de autocontrol dentro de la industria alimentaria.

3.- El *kit Viasure Real Time PCR Detection* puede constituir un método alternativo rápido y eficaz para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos.

4.- La extracción de ácidos nucleicos se considera una etapa crítica a la hora de emplear ensayos moleculares basados en PCR a tiempo real para la detección de patógenos en matrices alimentarias. Por ello, es necesario llevar a cabo una correcta optimización del método de extracción que permita recuperar una mayor cantidad de moléculas de ADN de calidad adecuada, aumentando así la sensibilidad de la técnica.

5.- Cuatro de los métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de matriz alimentaria han mostrado ser eficaces para la posterior amplificación del ADN, por lo que podrían ser propuestos para la detección de *Salmonella* mediante el *Kit Viasure Real Time PCR Detection*. Sin embargo, podríamos proponer el método *Viasure Quick Lysis Reagent Optimizado* (método C) por su sencillez y facilidad de uso.

CONCLUSIONS

1.- The results obtained show the advantage of real-time PCR molecular analysis for the detection of *Salmonella* spp. in food, obtaining the results in a shorter time than the conventional method established in the legislation.

2.- The commercial *Viasure Real Time PCR Detection Kit* for the detection of *Salmonella* spp., has shown that it has a similar sensitivity to the validated method with which it has been compared, so it could opt for its subsequent validation to be able to applied as a self-control system within the food industry.

3.- The *Viasure Real Time PCR Detection kit* can be a fast and effective alternative method for the detection of *Salmonella* spp. in food.

4.- Nucleic acid extraction is considered a critical stage when using real-time PCR-based molecular assays for the detection of pathogens in food matrices. For this reason, it is necessary to carry out a correct optimization of the extraction method that allows the recovery of a greater quantity of DNA molecules of good quality, increasing the sensitivity of the technique.

5.- Four of the methods for extracting nucleic acids from the food matrix have shown to be effective for the amplification of DNA, so they could be proposed for the detection of *Salmonella* using the *Viasure Real Time PCR Detection Kit*. However, we could propose the *Optimized Viasure Quick Lysis Reagent* method (method C) for its easiness and speed of the method.

6-. VALORACIÓN PERSONAL

En mi opinión, este TFG me ha parecido una elección muy acertada, ya que reúne muchas de las asignaturas que se explican en la carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA), como es la Higiene Alimentaria, la gestión de la Seguridad Alimentaria, legislación y microbiología alimentarias. De hecho, la seguridad alimentaria, junto con la microbiología alimentaria son dos de las asignaturas que me parecen más interesantes e importantes dentro de la carrera y, que sobre todo se aplican mucho en el día a día de nuestra vida, debido a la importancia que tiene garantizar que los productos que consumimos sean inocuos para la salud humana, a la par de nutritivos y apetecibles para los consumidores.

Además, este TFG, me ha permitido conocer la rama de la biología molecular más a fondo; una ciencia que en CTA no se explica tanto y solo se da de forma teórica. Me ha ayudado a ampliar mis conocimientos en esta ciencia, además de adquirir una mayor destreza en laboratorio. Encima, hoy en día, la técnica de la PCR, debido a la pandemia COVID-19, ha cobrado mucha importancia, y gracias a este TFG he conocido a fondo en que se basa, como llevar a la práctica este método molecular y saber comprender los resultados.

Me ha ayudado a conocer de una manera más extensa el campo de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos y poder acercarme a una de las ramas de lo que puede que en un futuro sea mi vida laboral.

7-. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2022). Salmonelosis. Madrid: AESAN. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm [Consultado 22-06-2022].

Bio-Rad. "IQ-Check Salmonella II PCR Detection Kit". Disponible en: https://www.bio-rad.com/es-es/product/iq-check-salmonella-ii-pcr-detection-kit?ID=d23decd6-2349-4e87-9087-3fe30ec6d3be&WT_mc_id=170125001114&WT_srch=1&WT_knsh_id=_kenshoo_clickid_&glid=Cj0KCQjw-daUBhCIARIsALbkjSaA_StRy57Jp2sXBNLkWvwrhvQDwdjbm6TS0az3H3yhIMZC92EZ4-MaAqEoEALw_wcB [Consultado 1-07-2022].

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M. & Morisset, D. (2014). "Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in food science & technology*, 37(2), 115-126. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414000661>

Costa, J. (2004). "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22 (5), pp. 299-305. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0213005X0473092X?token=FD1A53EBDC558AE41817558468A6BF9ABEAE1B38C82B564A1AF03A2B0589995FDC6532A4ADCFAB6B0A77206C3DD916B8&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220530170345>

Damkerng, B., Wannakarn, S. and Sudsai, T. (2021). "Taqman probe based multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *LWT-Food science and Technology*. Vol 147. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821008495?casa_token=ssr0rHFUgqMAAAAA:0w_aCl2Gs38NtRdZuGGXz563BJmPV0A7x20LnFYR92hENTceXISAmIkYqOa6GOSFxnLGBTWOLAE

De Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Michael, G.B., Cardoso, M.I.R, Wageck, C. and Brandelli, A. (2003). Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different source. *Braz J Microbiol* 34, pp. 123-124. doi: 10.1590/ S1517-83822003000500042

Dooley, J., Paine, K., Garrett, S. and Brown, H. (2004). "Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays". *Meat Science*, 68 (3), pp. 431-438. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174004001111>

DuPont Qualicon. "Sistema Bax, análisis PCR para *Salmonella*". The miracles of science. Disponible en: http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/BAX%20product%20descrip-Salmonella%20ESP.pdf [Consultado 1-07-2022].

European Food Safety Authority (EFSA) (2019). "The European Union One Health 2019 Zoonoses Report". *EFSA Journal*, 19 (2). Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6406> [Consultado 24-06-2022].

European Food Safety Authority (EFSA) (2020). "The European Union One Health 2019 Zoonoses Report". *EFSA Journal*, 19 (12). Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2021.6971> [Consultado 24-06-2022].

European Food Safety Authority (2022). *Salmonella*. EFSA. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/salmonella> [Consultado 24-06-2022].

Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (2021). *Salmonella*. ELIKA. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/salmonella/> [Consultado 22-06-2022].

Instituto de Salud Carlos III (2017-2018). "Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018. Ministerio de Ciencia e Innovación. Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/RENAVE_Informe_anual__2017-2018.pdf [Consultado 28-06-2022].

Martín, J.M. (2016). "Validación de la técnica de detección de *Listeria Monocytogenes* en alimentos por PCR a tiempo real". Trabajo de Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/65796/TRABAJO%20FINAL%20DE%20GRADO_%20Javier%20Marcos_14561379250152724667806716347125.pdf?sequence=2

Montalvo Navarro, C.A. y Lugo Flores, M.A. (2016). "Electroforesis: fundamentos, avances y aplicaciones". *Epistemus*, pp. 48-54. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/hevila/EpistemusCienciatecnologiaysalud/2019/vol13/no26/7.pdf>

Pedrosa Amado, A. (1999). "Chain reaction of Polymerase". *Archivo médico de Camagüey*, 3 (2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011

Reglamento (CE) Nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. Boletín Oficial del Estado (BOE). Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2004/139/L00001-00054.pdf> [Consultado 27-06-2022].

Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Boletín Oficial del Estado (BOE). Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2005/338/L00001-00026.pdf> [Consultado 27-06-2022].

Sánchez, A.C. (2012). "Identificación y cuantificación de especies del género *Merluccius* mediante la utilización de PCR a tiempo real". Tesis Doctoral. Universidad de Vigo. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/54512>

Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J. y Sierra Palacios, E. (2007). "PCR: reacción en cadena de la polimerasa". *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, pp. 53- 74. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Ramirez-Salcedo/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/Microarreglos-de-DNA-Fabricacion-Proceso-y-Analisis.pdf#page=69

Silva, G y López, H. (2011). "Genes involucrados en a patogénesis, persistencia y excreción de Salmonella en modelos animales". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25 (1). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000100013

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. and Velasquillo, C. (2013). "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real". *Medigraphic*, 2 (2), pp. 70-78. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52083062/pcr_medig_graphic-wi th-cover-page-v2.pdf?Expires=1653338895&Signature=Z-a~ksyueV4tGNkUM91D0sBAJ-NZFHsUJ8EX2nh8lv92YiDSb4ymDMs3AvqDIOIBHvkZrT~o1dDYS9nfheALEbZag5M7xNL97dn4ExeloFS-JT1XsHWBZ7eIFRsz7Oell00E0nQynr~6~AGO7dCDlxqV0nBHiKqBUcTZXqe9F3dUvYG7L5Fs9tjf-L6G5SWEWcYKuY-aVI8UDMCDYeVwulxrJzNWpJD3HnE6CRPHcL98mbjHtRK-t5ZyYztrzd~n~IqQ802ASd7NnJhUv-7N
Mc~tRTSszJzsBYBb2hD2ETGZCpWlyeBlBxpp9dhGFGbqzuVQ9fj6J7gJyGV6DPsA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

ThermoFisher. "Nota de la aplicación PCR en tiempo real: Qué es el valor Ct. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> [Consultado 25-08-2022].