

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL



Detección de la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en alimentos por técnicas de cultivo y técnicas moleculares

TRABAJO FIN DE GRADO EN:

Grado en Ciencias y Tecnología de los Alimentos

Alumna: **Patricia María Esteve Redondo**

Directora Académica/Tutora: **Dra. Salut Botella Grau**

Directora Experimental: **Dña. Aya Boukharouba**

Curso Académico: 2016-2017

Valencia, Junio de 2017

Detección de la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en alimentos por técnicas de cultivo y técnicas moleculares

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en alimentos, utilizando técnicas de cultivo basadas en métodos normalizados y comparando la efectividad de diferentes medios de enriquecimiento y aislamiento. Se ha realizado un estudio comparativo entre los métodos tradicionales de aislamiento por cultivo y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección e identificación de estos microorganismos.

Para la realización del trabajo experimental se han utilizado alimentos de venta al público de diferentes tipos: muestras de carnes de pollo (pechuga, hamburguesa y fiambre), vegetales (lechuga, espinacas y acelgas) y aguas.

El estudio de la presencia de los microorganismos se ha valorado con recuentos microbiológicos de enterobacterias y análisis de presencia/ausencia de los dos géneros con métodos normalizados o basados en métodos normalizados realizando los cuatro pasos fundamentales de preenriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación. En el caso de *E. coli*, dado que no existe una normativa específica, se realizaron modificaciones de este protocolo para seguir una metodología de trabajo similar en los dos géneros estudiados.

La detección molecular de la presencia de estos microorganismos se ha realizado a partir de los medios de preenriquecimiento y enriquecimiento, por amplificación de secuencias específicas de cada género tras la extracción del DNA de las muestras.

Se han analizado un total de 44 muestras de alimentos y agua a partir de las cuales se han aislado un total de 21 cepas de *E. coli* en el 38,63 % de las muestras. No se ha obtenido ningún aislado de *Salmonella* spp.

La utilización de la técnica PCR facilita y reduce el tiempo empleado para la detección de estos microorganismos. Además, ha resultado ser más sensible que el cultivo, detectando la presencia de los dos microorganismos en muestras en las que no se aislaron por métodos culturales.

Las cepas aisladas en este trabajo han sido caracterizadas, tanto fenotípicamente, mediante una batería de pruebas bioquímicas, como genotípicamente por PCR, con una reducción importante del tiempo empleado.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., enterobacterias, alimentos, métodos culturales, PCR múltiple.

Alumna: Dña. Patricia María Esteve Redondo

Directora Académica: Dra. Salut Botella Grau

Directora Experimental: Dña. Aya Boukharouba

Valencia, Junio 2017

Detection of the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in food by culture techniques and molecular techniques

Abstract

The aim of this work has been to study the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in foods, using culture techniques based on standard methods and comparing the effectiveness of different enrichments and isolation media. A comparative study has been realized between the traditional culture isolation methods and the technology of the chain reaction of the polymerase (PCR) for detection and identification of the microorganisms.

For the realization of the experimental work has been used food of public sale of different types: samples of meat (chicken breast, hamburger and ham), vegetables (lettuce, spinach and chard) and water.

The study of the presence of microorganisms has been evaluated with microbiological counts of enterobacterias and analysis of presence / absence of the two genera using standardized methods or based on standardized methods, performing the four fundamental steps of pre-enrichment, enrichment, isolation and identification. In the case of *E. coli*, as there is no specific regulation, modifications of the protocol were made to follow a similar methodology of work in the two genera studied.

The molecular detection of the presence of these microorganisms has been carried out from the means of pre-enrichment and enrichment, by amplification of sequences specific to each genus after extraction of DNA from the samples.

A total of 44 food and water samples were analysed from which a total of 21 *E. coli* strains were isolated in 38.63% of the samples. Negative results were obtained for the *Salmonella* spp.

The use of the PCR technique facilitates and reduces the time used for the detection and identification of these microorganisms. In addition, it has been found to be more sensitive than culture, detecting the presence of the two microorganisms in samples in which they were not isolated by cultural methods.

The strains isolated in this work have been characterized, both phenotypically, by a battery of biochemical tests, and genotypically by PCR, with a significant reduction of the time used.

Key words: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., enterobacterias, food, cultural methods, multiplex PCR.

Author: Dña. Patricia María Esteve Redondo

Academic director: Dra. Salut Botella Grau

Experimental director: Dña. Aya Boukharouba

Valencia, June 2017

AGRADECIMIENTOS

A Salut por brindarme la oportunidad de poder realizar este trabajo. Gracias por tu paciencia, por la confianza ofrecida, por tu gran dedicación y por hacer fácil lo difícil.

A mis padres y a mi hermana por los esfuerzos que han hecho para conducirme hasta aquí. Gracias por ayudarme y estar siempre ahí, sin vosotros la carrera y en definitiva este trabajo no hubiese sido posible.

A Sergio por sus consejos, por repetirme una y otra vez que lo estaba haciendo bien, por su forma de alegrarme el día y sobre todo por haber tenido paciencia conmigo en este tiempo en el que he sido difícil de tratar.

A Vera, Anahí y María por los momentos especiales compartidos durante esta etapa.

Y a mis compañeras de laboratorio, Aya, Isabel y Lady. Sin vosotras este trabajo hubiese sido mucho más largo y menos entretenido.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS	1
2.	CRITERIO MICROBIOLÓGICO	1
	2.1. Carne: calidad microbiológica	1
	2.2. Vegetales: calidad microbiológica.....	2
	2.3. Queso: calidad microbiológica	3
	2.4. Agua: calidad microbiológica	3
3.	ENTEROBACTERIAS EN LOS ALIMENTOS.....	3
	3.1. <i>Escherichia coli</i>	4
	3.1.1. El organismo y sus características.....	4
	3.1.2. Clasificación actual.....	4
	3.1.3. Poder patógeno	4
	3.2. <i>Salmonella</i> spp.	6
	3.2.1. El organismo y sus características.....	6
	3.2.2. Clasificación actual.....	6
	3.2.3. Poder patógeno	7
4.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS NORMALIZADOS	9
II.	OBJETIVOS.....	11
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	12
1.	MUESTRAS.....	12
2.	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS POR MÉTODOS CULTURALES.....	12
	2.1. Preparación de muestras	12
	2.2. Recuento de enterobacterias.....	12
	2.3. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> por métodos culturales.....	12
	2.4. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp. por métodos culturales	13

3.	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. EN ALIMENTOS POR PCR	15
3.1.	Cepas de referencia.....	15
3.2.	Extracción de ADN.....	15
3.3.	Reacción en cadena de la Polimerasa: PCR múltiple	15
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
1.	RECuento DE ENTEROBACTERIAS	17
2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> POR MÉTODOS CULTURALES.....	17
3.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. POR MÉTODOS CULTURALES.....	19
4.	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. POR PCR MÚLTIPLE.....	20
4.1.	Extracción de DNA.....	20
4.2.	Reacción en cadena de la Polimerasa: PCR múltiple	20
5.	VALORACIÓN CONJUNTA DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN	21
V.	CONCLUSIONES.....	24
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	25
VII.	ANEXOS.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos para la detección de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. en la mPCR	15
Tabla 2. Condiciones utilizadas en la mPCR de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.....	16
Tabla 3. Resultados del recuento de enterobacterias	17
Tabla 4. Resultados del aislamiento en carnes de <i>Escherichia coli</i> en medios selectivos	18
Tabla 5. Resultados del aislamiento en vegetales de <i>Escherichia coli</i> en medios selectivos	18
Tabla 6. Resultados del aislamiento en agua de <i>Escherichia coli</i> en medios selectivos.....	19
Tabla 7: Valoración conjunta de la detección de <i>Escherichia coli</i> por métodos culturales y moleculares por mPCR.....	22
Tabla 8: Valoración conjunta de la detección de <i>Salmonella</i> spp. por métodos culturales y moleculares por mPCR.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencias de los microorganismos más relevantes causantes de infecciones gastrointestinales.....	8
Figura 2. Productos de amplificación de la PCR múltiple con diferentes concentraciones de MgCl ₂	21
Figura 3. Productos de amplificación de la PCR múltiple con diferentes concentraciones de DNA y dNTP	21
Figura 4. Resultados de amplificación por PCR múltiple.....	21

ABREVIATURAS

APPCC Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

a_w Actividad del agua

BES Boletín Epidemiológico Semanal

CCAA Comunidades autónomas

CECT Colección Española de Cultivos Tipo

DNA Deoxyribonucleic acid

ECAD *Escherichia coli* de adherencia difusa

ECDC European Centre for Disease Prevention and Control

ECEA *Escherichia coli* enteroagregante

ECEI *Escherichia coli* enteroinvasivo

ECEH *Escherichia coli* enterohemorrágico

ECEP *Escherichia coli* enteropatógeno

ECET *Escherichia coli* enterotoxigénico

EFSA European Food Safety Authority

ECVT *Escherichia coli* verotoxigénico

IMViC Indol, Rojo de metilo, Vogler Proskauer, Citrato de Simmons

ISO International Organization for Standardization

LPSN List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

MAGRAMA Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente

mPCR Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple.

OMS Organización Mundial de la Salud

pb Pares de bases

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

RNA Ribonucleic acid

TSI Triple Sugar Iron

UE Unión Europea

VRBD Agar cristal violeta-rojo neutro-bilis-D-glucosa

I. INTRODUCCIÓN

1. INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

Uno de los grandes retos que se aborda a nivel mundial es conseguir la inocuidad de los alimentos con el objetivo, entre otros, de disminuir el número de enfermedades de transmisión alimentaria.

Las enfermedades de transmisión alimentaria se deben a la ingesta de alimentos contaminados por bacterias, virus, parásitos o por sustancias químicas nocivas. Estas enfermedades no solo suponen un problema de salud pública, sino que ocasionan un gran impacto socioeconómico, causando desconfianza frente a un alimento, un producto o una empresa y sobretodo, grandes pérdidas para el sector público y privado.

Centrándonos en las enfermedades de transmisión alimentaria de etiología microbiana y más concretamente en las causadas por bacterias, cabe destacar que, según la OMS (2015), las bacterias que figuran entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes son *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enterohemorrágica. Estas y otras bacterias causan millones de enfermedades cada año y a pesar de que cualquier individuo puede contraerlas, los principales grupos de riesgo son los niños, personas mayores, mujeres gestantes y en general, individuos inmunodeprimidos.

Por otro lado hay que tener en cuenta que hace dos décadas, la lista de bacterias causantes de estas enfermedades era muy diferente. La epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos cambia rápidamente a medida que emergen patógenos recién reconocidos y a medida que los patógenos bien reconocidos aumentan en la prevalencia o se asocian con nuevos vehículos alimenticios (Altekruse y col., 1997).

Por esta serie de motivos hay que poner especial interés en los patógenos reconocidos y emergentes e investigar nuevos métodos, como por ejemplo los métodos moleculares, para detectar más rápidamente estos microorganismos.

2. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

En la Unión Europea, y por tanto en España, los criterios microbiológicos vigentes que definen la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento, se rigen por el Reglamento (CE) 2073/2005 y sus sucesivas modificaciones.

Estos criterios microbiológicos se dividen en dos clases, los criterios de seguridad alimentaria, donde su incumplimiento supondría que el producto o lote de productos no se podría comercializar o se retiraría del mercado y los criterios de higiene de proceso donde se valora si el funcionamiento del proceso de producción es aceptable o no.

En función del tipo de alimento la legislación establece unos criterios microbiológicos y por tanto una serie de microorganismos o toxinas que se deben analizar mediante una técnica de referencia, que normalmente es una norma de calidad ISO. Los microorganismos y toxinas que se suelen pedir como criterio de seguridad alimentaria son entre otros *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Cronobacter* spp., *Escherichia coli*, histamina y enterotoxinas estafilocócicas y los que se suelen pedir como criterio de higiene del proceso son recuento de colonias aerobias, enterobacterias, *Salmonella*, *Escherichia coli*, estafilococos coagulasa positivos y *Bacillus cereus*.

2.1. Carne: calidad microbiológica

La carne es uno de los componentes básicos de la alimentación humana gracias a su alto valor proteico pero también es uno de los alimentos más perecederos. Su composición, su pH y su actividad de agua, hacen que sea un medio muy favorable para muchos microorganismos.

Para la aceptabilidad de las carnes (canales, carne fresca, refrigeradas o congeladas, picadas, etc.), los parámetros microbiológicos que se necesitan controlar como criterios de higiene del proceso y/o seguridad alimentaria son los recuentos de aerobios mesófilos, recuentos de **enterobacterias**, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

En España la carne de pollo es la segunda más consumida, sólo por detrás de la carne cerdo, esto se debe a su bajo coste y a su bajo contenido en grasa. Sin embargo la presencia de microorganismos patógenos y alterantes sigue siendo una preocupación importante en el sector avícola, ya que dentro de los productos alimenticios ha sido el más implicado en casos confirmados de *Salmonella* y *Campylobacter*. Hay que destacar que en la carne de pollo, *Salmonella* tiene un papel muy relevante como criterio de seguridad alimentaria, ya que en las canales de pollo se pide ausencia en la zona examinada tras la refrigeración, en la carne picada se pide ausencia en 25 gramos durante su vida útil y en productos cárnicos que van a ser consumidos cocinados, se pide ausencia en 10 gramos también durante su vida útil.

La contaminación comienza a desarrollarse en el matadero y las causas son muy diversas. Puede ser debido a la contaminación cruzada entre aves vivas y canales, a una temperatura insuficiente durante el proceso de escaldado, a un inadecuado enfriamiento final, a un transporte con unas condiciones higiénicas inadecuadas, etc... Por este motivo son necesarias, durante la producción primaria y durante el transporte, unas buenas prácticas de higiene que, según el código de prácticas del Codex sobre la producción de alimentos de origen animal (FAO, y OMS 2009) deberán incluir: la salud e higiene de los animales, registros de los tratamientos, piensos e ingredientes de los piensos y factores ambientales pertinentes, así como la aplicación de los principios de APPCC en la mayor medida posible.

2.2. Vegetales: calidad microbiológica

En la actualidad ha aumentado la producción de vegetales de hoja fresca, asociándose el consumo con un estilo de vida más saludable. Sin embargo, como el consumo se realiza sin ningún proceso previo de eliminación o reducción del número de microorganismos, puede suponer un problema grave de seguridad alimentaria.

Las verduras de hoja fresca pueden contaminarse por diferentes causas, donde las principales son: agua de riego contaminada, el equipo de cultivo, la forma de recolección, un transporte con unas medidas higiénicas inadecuadas y la materia fecal.

La materia fecal animal y humana constituye una importante fuente de microorganismos patógenos para el hombre. Uno de dichos microorganismos es la *Escherichia coli* O157:H7, pero se sabe también que contiene *Salmonella*, *Cryptosporidium* y otros organismos patógenos, por lo que el uso de desechos biológicos sólidos o estiércol tiene que controlarse cuidadosamente para reducir la posibilidad de contaminación.

Según la FAO (2009) la mejor estrategia posible para mejorar la calidad microbiológica es prevenir la contaminación del alimento a lo largo de toda la cadena de producción y distribución, conjuntamente con la ejecución de determinados tratamientos sanitarios y el mantenimiento del producto en condiciones desfavorables para el desarrollo de los microorganismos. Y con este fin se necesita la aplicación de buenas prácticas agrícolas (BPA), de buenas prácticas de manufacturación (BPM), y la aplicación de APPCC para determinar los puntos críticos en donde la seguridad alimentaria puede ser amenazada.

Para la aceptabilidad de los vegetales (troceados, ensaladas envasadas y zumos), los parámetros microbiológicos que se necesitan controlar como criterios de higiene del proceso y/o seguridad alimentaria son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

2.3. Queso: calidad microbiológica

En los últimos años el queso ha sido el vehículo de diversos brotes de enfermedades alimentarias y la leche cruda, pasterizada inadecuadamente, es el principal factor.

La microbiota de la leche se compone por microorganismos que pueden ejercer un papel beneficioso, como las bacterias lácteas, produciendo cambios deseables en las características físico-químicas de la leche durante la elaboración de productos lácteos y se compone también por microorganismos que pueden causar efectos negativos.

Entre los causantes de efectos negativos se puede distinguir los microorganismos patógenos, los cuales provocan serios problemas en la salud del consumidor y los microorganismos alterantes que afectan a la calidad del producto. Pero normalmente la barrera entre estos dos grupos no está muy definida y va a depender de la concentración en que se encuentre el microorganismo en el producto lácteo.

Por otra parte hay que indicar que la leche aunque proceda de animales sanos y se haya obtenido en las mejores condiciones higiénicas, es siempre susceptible de contaminación en mayor o menor grado (Pascual y Calderón, 2013). Y por este motivo hay que poner especial atención a las fuentes de posible contaminación, las cuales son muy diversas y entre otras pueden ser: el estado sanitario del animal, las condiciones de ordeño, la contaminación del ambiente, el estado sanitario de los equipos y el agua de limpieza de los equipos.

Para la aceptabilidad de leche y queso (leche cruda, tratada térmicamente, quesos a base de leche cruda, o tratada térmicamente, de pasta blanda no madurados o madurados, etc.), los parámetros microbiológicos que se necesitan controlar como criterios de higiene del proceso y/o seguridad alimentaria son los recuentos de aerobios mesófilos, recuentos de **enterobacterias**, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, ***Escherichia coli*** y ***Salmonella spp.***

2.4. Agua: calidad microbiológica

El agua es un recurso fundamental en la vida de los seres vivos. Su contaminación, que normalmente es causada por el hombre, altera su calidad y la vuelve inadecuada tanto para las actividades agrícolas como para el consumo humano, ya que cuando el agua entra en contacto con frutas y hortalizas, la posibilidad de contaminación de estos productos por microorganismos patógenos depende de la calidad de la misma.

El agua contaminada es un vehículo para muchos microorganismos patógenos, entre otros bacterias como *Campylobacter jejuni*, variedades patógenas de ***Escherichia coli***, *Legionella spp.*, y ***Salmonella spp.***, virus como Adenovirus o Enterovirus, y Protozoos como *Acanthamoeba spp.* Los brotes de transmisión hídrica tienen un gran impacto en la salud pública debido al gran número potencial de población expuesta (BES, 2008). En España se declararon 433 brotes con mecanismo de transmisión hídrico en los años 1999-2006, con un total de 24.610 casos, 213 hospitalizados y 2 defunciones (BES, 2008).

Para la aceptabilidad de las aguas en la industria alimentaria, los parámetros microbiológicos que se necesitan controlar como criterios de higiene del proceso y/o seguridad alimentaria son los recuentos de aerobios mesófilos, recuentos de **enterobacterias**, *Listeria monocytogenes*, *clostridios*, *enterococos*, ***Escherichia coli*** y ***Salmonella spp.***

3. ENTEROBACTERIAS EN LOS ALIMENTOS

Uno de los parámetros analizados como criterio de higiene del proceso en la mayoría de los alimentos es, sin duda, el recuento de enterobacterias.

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un amplio grupo heterogéneo de bacterias Gram negativas que se encuentran en suelo, agua, vegetales y microbiota intestinal de animales y humanos. En lo que respecta a las enfermedades de transmisión alimentaria, esta familia incluye

diversos patógenos humanos. Los más relevantes son, entre otros, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Yersinia*.

Desde el punto de vista clínico ocasionan fundamentalmente infecciones del tracto urinario o entéricas y una amplia variedad de síndromes clínicos en los enfermos hospitalizados o en los inmunodeprimidos como neumonías, septicemias, meningitis, abscesos abdominales, además de infecciones urinarias (Almirante, 2013).

3.1. *Escherichia coli*

La especie *Escherichia coli* pertenece al género *Escherichia*, de la familia *Enterobacteriaceae* y se trata de bacterias baciliformes, Gram negativas y casi siempre móviles.

3.1.1. El organismo y sus características

Escherichia coli es una especie baciliforme, de aproximadamente 0,5 µm de largo por 3 µm de ancho. Es catalasa positiva y oxidasa negativa, es no esporógena y presenta una fermentación característica de la lactosa.

Se trata de un organismo mesófilo típico que crece desde 7-10 °C hasta 50 °C, con una temperatura óptima en torno 37 °C. No presenta termorresistencia acusada y es capaz de resistir el almacenamiento en refrigeración o en congelación durante tiempos prolongados (Adams y Moss, 1997).

Por otra parte, siendo óptimas las demás condiciones de crecimiento (temperatura, a_w , nutrientes) puede crecer a pH inferior a 4,4 pero su pH de crecimiento óptimo es alrededor de pH casi neutro. Y respecto a su a_w mínima de crecimiento es aproximadamente 0,95.

3.1.2. Clasificación actual

El género *Escherichia* está compuesto según "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" por 8 especies (LPSN, 2013):

- *Escherichia adecarboxylata*
- *Escherichia albertii*
- *Escherichia blattae*
- *Escherichia fergusonii*
- *Escherichia hermannii*
- *Escherichia marmota*
- *Escherichia vulneris*
- *Escherichia coli*

3.1.3. Poder patógeno

La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* no son patógenas, sin embargo algunas de ellas, como las cepas productora de toxina Shiga pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos (OMS 2016).

Basándose en los síndromes, en las características de las enfermedades y también en los grupos serológicos, se diferencian siete grupos virulentos de *Escherichia coli* (Rodríguez, 2002; Bastidas, 2013; MAGRAMA, 2017):

***Escherichia coli* enteroinvasivo (ECEI)**

El mecanismo de patogenicidad de estos serotipos es la invasión del epitelio del colon. La bacteria se adhiere a las vellosidades de la mucosa, requiriendo de mucinasa y adhesinas, para

después entrar por endocitosis a la célula, y posteriormente multiplicarse y diseminarse a células sanas adyacentes.

Los síntomas característicos producidos por estas cepas son diarrea acuosa, con sangre, moco y dolor abdominal. Las cepas se asocian más a brotes que a casos aislados, en los que la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños sobre seis meses de edad.

Escherichia coli enterotoxigénico (ECET)

Los serotipos de ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias, su principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de enterotoxinas llamadas toxinas termolábiles y toxinas termoestables.

Causan una enfermedad, tanto en niños como en adultos, que tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h y donde el cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda y en pocos casos, fiebre y vómito. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10^8 UFC.

Escherichia coli enteropatógeno (ECEP)

Este serotipo es un patógeno bacteriano que se adhiere a las células epiteliales intestinales, provocando diarrea. Constituye un riesgo significativo para la salud humana y sigue siendo una causa importante de mortalidad infantil en los países en desarrollo.

Escherichia coli enteroagregante (ECEA)

Los serotipos ECEA son un conjunto de cepas que originalmente pertenecían al grupo ECEP y estaban agrupadas por su modo peculiar de adherencia entre sí y a células eucariotas. Estas cepas fueron aisladas en pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo ECEP pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a ECEP.

Escherichia coli verotoxigénico (ECVT)

Este grupo también recibe el nombre de *Escherichia coli* shigatoxigénico ya que estas cepas son capaces de producir unas toxinas llamadas toxinas shiga o verocitotoxinas.

Hay varios serotipos en este grupo pero el más relevante en personas es el serotipo O157:H7, ya que solamente en el conjunto de países de la UE, hubieron 5.955 casos confirmados en 2014.

Las cepas de este grupo provocan síntomas que van desde una diarrea suave a una diarrea sanguinolenta grave y algunos de los casos, la infección puede acarrear un riesgo vital, sobretodo en pacientes jóvenes y ancianos.

Escherichia coli enterohemorrágico (ECEH)

Se trata de un conjunto de *E. coli* patógenas, que pueden causar diarrea con sangre o colitis hemorrágica en humanos. En ocasiones la colitis hemorrágica deriva en síndrome hemolítico urémico (SHU) y esto supone una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos. En los ancianos, la tasa de letalidad por el SHU puede elevarse al 50 %.

Desde 1980 se reconoce la cepa *E. coli* O157:H7 como causa de este síndrome pero a partir de 2011 también se reconoce la cepa *E. coli* O104:H4 como causa de esta enfermedad. A pesar de que se desconoce el por qué la cepa O104:H4 es tan virulenta se ha especulado de que su capacidad enteroagregativa le permita colonizar mejor el epitelio intestinal.

Debido a que muchos factores de virulencia (incluso la verocitotoxina) se llevan en los plásmidos o en bacteriófagos, existe la posibilidad de que surjan nuevas cepas de *E. coli* que posean nuevos patrones de la enfermedad y/o sean difíciles de clasificar por los sistemas actuales, como ha sido el caso de la cepa O104:H4, la cual posee multitud de factores de virulencia.

Escherichia coli de adherencia difusa (ECAD)

Estos serotipos se han asociado más a procesos diarreicos de tipo agudo y más persistente en niños que en adultos. Dentro de las principales características observadas en la patogénesis de ECAD están las siguientes: unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal, producción de citotoxinas y enterotoxinas y finalmente, el desarrollo de una inflamación grave de la mucosa.

La especie *Escherichia coli* se considera parte de la biota habitual del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales. Por este motivo y debido a su supervivencia en el agua se utiliza como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos. Además tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente (Pascual y Calderón, 2013).

Como principales alimentos implicados tenemos la carne picada insuficientemente cocinada y la leche fresca, pero un número creciente de brotes se asocian al consumo de frutas y **verduras** (coles de Bruselas, **espinacas**, **lechuga** y ensaladas en general) contaminadas por el contacto con las heces de animales domésticos o salvajes en algún momento durante su cultivo o manipulación (OMS 2016).

3.2. Salmonella spp.

El género *Salmonella*, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, agrupa bacterias baciliformes Gram-negativas anaerobias facultativas. La mayoría de estas bacterias son consideradas patógenos humanos, aunque se diferencian en las características y en la gravedad de la enfermedad que producen.

3.2.1. El organismo y sus características

El género *Salmonella* está formado por bacilos de aproximadamente 0,5 µm de largo por 1-3 µm de ancho. Generalmente no son capaces de fermentar la lactosa, sacarosa o salicina, aunque fermentan la glucosa y algún otro monosacárido, produciendo gas (Jay y col., 2009).

Son catalasa positivos y oxidasa negativos, no forman esporas, reducen nitratos a nitritos y respecto a la movilidad, la mayoría son móviles gracias a los flagelos peritricos a pesar de que existen variantes no flageladas.

Al igual que la mayoría de bacterias los parámetros de crecimiento más importantes son la temperatura, el pH, la actividad de agua y los nutrientes.

Acerca de la temperatura ha sido registrado crecimiento desde temperaturas por debajo de 5 °C hasta 47 °C con un crecimiento óptimo a 37 °C (Adams y Moss, 1997). Se trata de bacterias termosensibles por lo que pueden ser destruidas fácilmente por temperaturas de pasteurización. Otra forma de destrucción es mediante el proceso de congelación pero hay que tener en cuenta que a pesar de que el proceso dañe la bacteria no garantiza su destrucción total en los alimentos.

Respecto al pH, para un crecimiento óptimo la *Salmonella* requiere un pH entre 6,6 y 8,2 (Jay y col., 2009), los valores por encima de 9 y por debajo de 4 tienen efecto bactericida. Y respecto a la actividad del agua la mínima se halla en torno a 0,93 pero puede sobrevivir años en alimentos con a_w baja.

3.2.2. Clasificación actual

A lo largo de los años ha habido discrepancia en lo que respecta a la taxonomía del género *Salmonella*. Actualmente según la LPSN (2013) salmonella contiene 9 especies y 14 subespecies que son:

- *Salmonella arizonae*
- *Salmonella bongori*
- *Salmonella choleraesuis*: Con sus respectivas subespecies que son *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica* y *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*.
- *Salmonella entérica*: con sus respectivas subespecies que son *Salmonella enterica* subsp. *bongori*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella entérica* subsp. *enterica*, *Salmonella entérica* subsp. *houtenae*, *Salmonella entérica* subsp. *indica* y *Salmonella entérica* subsp. *salamae*.
- *Salmonella enteritidis*
- *Salmonella paratyphi*
- *Salmonella typhi*
- *Salmonella typhimurium*
- *Salmonella subterranea*

Independientemente de su especie y subespecie, se clasifican en base a sus antígenos, que son de 2 tipos; somáticos (O) y flagelares (H) y las diferentes combinaciones de antígenos que presentan permiten clasificarlas en serotipos.

Jay y col. publicaron en 2009 una agrupación desde la perspectiva epidemiológica, clasificando el género *Salmonella* en tres grupos:

- En el primer grupo se incluyen los agentes de las enfermedades más graves producidas por *Salmonella* (fiebre tifoidea y paratifoidea) que son *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* C.

- En el segundo grupo se incluyen las adaptadas al hospedador como *S. gallinarum* o *S. dublin*. Algunas de las que pertenecen a este grupo pueden ser transmitidas a través de los alimentos y ser patógenas para el hombre.

- Y en el tercer grupo se incluyen las serovariedades no adaptadas al hospedador, la mayoría de origen alimentario y patógenas para el hombre y otros animales.

3.2.3. Poder patógeno

Salmonella spp. es un género de enterobacterias que agrupa a microorganismos patógenos causantes de gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos, y que presenta diversas formas de transmitirse a las personas.

Normalmente la forma más habitual de transmisión es a través del consumo de alimentos contaminados pero también puede ser mediante el contacto con animales infectados, incluidas las mascotas. Las bacterias pueden ser diseminadas por medio de las heces al suelo, al agua, a los alimentos y piensos y desde estos medios a otros animales. Y no hay que olvidar que también pueden transmitirse entre las personas por vía fecal-oral.

La dosis infectiva varía dependiendo de la edad y estado de salud de la víctima, del alimento y de la cepa (Forsythe, 2003) y puede causar cuadros clínicos diferentes:

Fiebre tifoidea

Es una enfermedad de origen entérico producida por *Salmonella typhi*. También puede ser producida por *Salmonella paratyphi A*, *paratyphi B* y *paratyphi C*, pero no es tan habitual y los síndromes son de menor gravedad.

Estas serovariedades sólo afectan al ser humano y sus síntomas son: malestar general, fiebre alta, diarrea, distensión abdominal y manchas rojas en la piel. La mortalidad con un tratamiento adecuado es casi nula y las complicaciones pueden ser la perforación y la hemorragia intestinal.

En España, según el informe anual del 2014 sobre los resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles (2016), la tasa de incidencia ha disminuido en los últimos años y continúa por debajo de la tasa media de los países de la Unión Europea (0,25 casos por 100.000 habitantes en 2012).

Salmonelosis

Es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más extendidas, sus síntomas; vómitos, dolor abdominal y diarrea, generalmente son leves sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida (OMS, 2016).

En la Unión Europea el número de casos confirmados de salmonelosis en 2015 fue de 94.625 y la tasa total de notificación fue de 21,2 casos por 100.000 habitantes, representando un aumento del 1,9 % en la tasa de notificación de la UE con respecto a 2014 (EFSA y ECDC, 2016). Y solamente en España según el informe anual del sistema de información microbiológica del 2015 se notificaron un total de 5.215 aislamientos de *Salmonella* no tifoidea procedentes de 72 laboratorios de 11 CCAA.

Cabe destacar que hay muchos serotipos que pueden causar este cuadro clínico pero en la actualidad, según el informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas del 2014 (MAGRAMA, 2017) los serotipos no tifoideos más prevalentes en países occidentales son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*.

Aunque ha disminuido la incidencia de gastroenteritis producidas por estos microorganismos en los últimos años, sigue siendo la segunda causa de infecciones gastrointestinales, como se puede observar en la Figura 1.

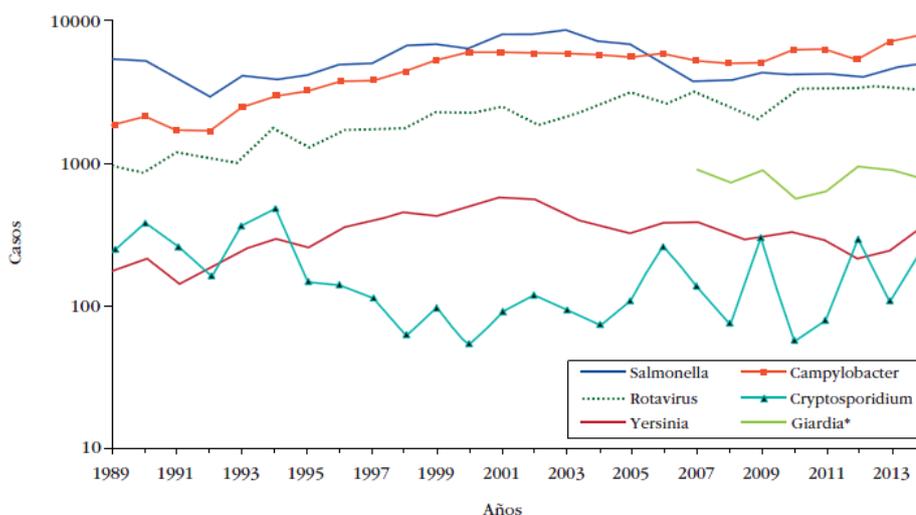


Figura 1. Tendencias de los microorganismos más relevantes causantes de infecciones gastrointestinales. Casos notificados al Sistema de Información Microbiológica. España 1989-2014 (BES 2014)

Los alimentos que transmiten principalmente esta bacteria son los huevos crudos y sus productos, la carne poco cocinada y sus derivados, la leche cruda y productos lácteos y el agua contaminada. Tampoco hay que olvidar la contaminación cruzada durante la manipulación ni los productos vegetales, ya que debido a la utilización de agua de riego contaminada pueden contener *Salmonella*.

Según datos del último informe de la EFSA y ECDC sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario en 2015, la mayor frecuencia de detección se encontró en alimentos de origen cárnico que se destinan a ser cocinados antes del consumo: en **carne de pollo** (6,5 %) y carne de pavo (4,6 %), mientras que en la carne de cerdo (1,7 %) y carne bovina (0,2 %) se encontró un menor número de muestras positivas (EFSA y ECDC, 2016).

4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS NORMALIZADOS

Los Criterios microbiológicos vigentes en la Unión Europea, y por lo tanto en España, se rigen por el Reglamento (CE) 2073/2005, así como sus sucesivas modificaciones. De acuerdo con el artículo 2 del citado Reglamento, el **criterio microbiológico** es el criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos y/o en la cantidad de toxinas/metabolitos por unidad de masa, volumen, superficie o lote. Esta legislación establece dos clases: Criterios de seguridad alimentaria y **Criterios de higiene del proceso**. A su vez, de cada criterio la legislación establece: Categoría de Alimento para el que rige, Microorganismos o sus toxinas o metabolitos, Plan de toma de muestras, Límites microbiológicos, Método analítico de referencia, y Fase del proceso de fabricación o comercialización en la que se aplica el criterio. Además, este Reglamento incluye las Normas para la toma de muestras y preparación de éstas para las pruebas y pautas para la interpretación de resultados.

Para analizar cada parámetro con el método analítico de referencia, se utilizan técnicas de recuentos microbiológicos y análisis de presencia/ausencia con los cuatro pasos fundamentales de preenriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación.

Debido a la escasa resistencia de algunas bacterias a condiciones ambientales hostiles, o a los tratamientos de elaboración y conservación de los alimentos, la tasa de aislamiento está muy influenciada por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en la misma y el estado fisiológico en que se encuentren.

Las muestras se someten a un preenriquecimiento en un medio líquido no selectivo que se incuba durante un periodo de 20 a 24 h, a un posterior enriquecimiento en un medio líquido selectivo que se incuba durante un periodo de 24 a 48 h, a una temperatura determinada según el tipo de microorganismo con el fin de recuperar los microorganismos que en condiciones más restrictivas no serían viables. Los medio de cultivo basan su acción en la presencia de un antibiótico que inhibe el crecimiento de la microbiota acompañante, así como la adición de nutrientes para estimular el crecimiento del microorganismo. El aislamiento se consigue con la siembra en triple estría en medios sólidos selectivos. Una vez se obtienen las colonias del patógeno, se siembran en un medio de mantenimiento para obtener un cultivo masivo. Posteriormente se realizarán los ensayos bioquímicos para su identificación.

Los métodos culturales suponen un proceso demasiado largo (5 días) para la identificación de microorganismos en alimentos, lo que constituye un riesgo para el consumidor. Recientemente, se están desarrollando técnicas moleculares normalizadas, más rápidas y específicas, para la detección e identificación de microorganismos.

Estas técnicas se basan en el estudio del DNA genómico bacteriano y surgieron para poder detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos o desarrollos tardíos.

Actualmente una de las técnicas más utilizadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pero cada vez más a partir ella se estudian diferentes variaciones, entre las cuales podemos

destacar la PCR en tiempo real que permite tanto cuantificar, como detectar y amplificar secuencias de DNA, la PCR anidada donde se realizan dos rondas de amplificación con diferentes pares de primers para aumentar la especificidad y sensibilidad y la PCR múltiple donde se consigue amplificar simultáneamente diferentes secuencias diana.

La PCR consiste en un proceso de amplificación, *in vitro*, de un fragmento de DNA o de RNA. El proceso se inicia mediante fragmentos cortos llamados cebadores o primers y está dividido en tres fases, desnaturalización de la doble cadena de DNA, hibridación de los iniciadores y extensión o elongación del cebador por la acción enzimática de la DNA polimerasa. El proceso se lleva a cabo en un termociclador y las tres fases, cada una con su temperatura y su tiempo de desarrollo, forman un ciclo. Normalmente se realizan entre 25 y 35 ciclos, dependiendo de la cantidad de DNA que se necesite amplificar.

Posteriormente para leer los resultados, una vez terminada la PCR, se procesan mediante electroforesis en gel de agarosa y para visualizarlos normalmente se añade una solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe, que emite fluorescencia cuando se une al DNA.

Cabe destacar que uno de los aspectos fundamentales en esta técnica es el diseño de los primers o cebadores ya que la especificidad de detección depende de la unión de los cebadores a las secuencias diana. Pero en muchos casos conocer esta secuencia diana es un proceso de un coste elevado y por este motivo se recurre a la información en los bancos de datos.

Respecto a las ventajas de utilizar esta técnica, hay que destacar que se trata de una técnica sencilla, rápida, sensible, y con la capacidad de detectar microorganismos que son indetectables por los métodos convencionales por encontrarse en muy bajo número en la muestra o por presentar condiciones fisiológicas que no les permiten crecer en los medios de cultivo convencionales.

II. OBJETIVOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una importante causa de morbilidad y mortalidad. Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas, casi 1 de cada 10 habitantes, por ingerir alimentos contaminados y que 420.000 mueren por esta misma causa (OMS, 2015).

Tanto *Salmonella* spp. como las variedades patógenas de *Escherichia coli* figuran entre las enterobacterias de transmisión alimentaria más comunes. Por este motivo, el **objetivo principal** de este trabajo es **determinar la carga microbiana de enterobacterias totales, y la presencia o ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en muestras de alimentos** que se encuentran disponibles en el mercado y en muestras de agua.

Para la determinación de estos microorganismos se han utilizado los métodos normalizados o basados en métodos normalizados, que aplican técnicas convencionales de cultivo en placa.

La necesidad de disponer de técnicas lo suficientemente rápidas y específicas aplicadas al diagnóstico de la presencia de estos microorganismos en alimentos, nos ha conducido a plantearnos los siguientes objetivos:

1. Realizar un muestreo en diferentes comercios de la Comunidad Valenciana para valorar la carga de enterobacterias en muestras de carne, queso, vegetales y aguas de riego.
2. Determinar la presencia o ausencia de *Escherichia coli* en las muestras de alimentos y agua por métodos culturales basados en métodos normalizados.
3. Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en las muestras de alimentos y agua por métodos culturales normalizados.
4. Realizar una búsqueda bibliográfica para encontrar un método molecular alternativo de detección e identificación de estos microorganismos más rápido, basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
5. Valorar conjuntamente los dos métodos de detección, culturales y moleculares.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

Se analizaron un total de **44** muestras de alimentos y aguas: 11 muestras de carne de pollo (fiambre, hamburguesa y pechuga), 11 muestras de vegetales (lechuga, espinacas y acelgas), 15 muestras de queso fresco y 7 muestras de agua.

Los análisis se realizaron entre los meses de octubre y de mayo. Las muestras de alimentos se adquirieron en pequeños comercios y supermercados y las muestras de agua se tomaron en zonas de riego de la Comunidad Valenciana. Todas las muestras se procesaron en las 24 h siguientes a su recolección.

2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS POR MÉTODOS CULTURALES

2.1. Preparación de las muestras

Las muestras de alimentos se procesaron en condiciones de asepsia. Se pesó una muestra de 25 gramos de cada alimento en una bolsa estéril de Stomacher y se le añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada (Ref. 02-277-500, Scharlau, Barcelona, España). A continuación se homogenizó en un homogenizador Stomacher durante un minuto.

Las muestras de agua se procesaron por filtración, basada en la norma ISO 9308-1. Se filtraron 250 mL de agua en membranas de 0,45 µm (Ref. Biotech) que se introdujeron en una bolsa estéril de Stomacher donde se añadió 225 mL de agua de peptona tamponada y se homogenizó manualmente durante un minuto.

2.2. Recuento de enterobacterias

Para el recuento de enterobacterias se siguió el protocolo detallado en la norma ISO 21528/2:2004 (Método horizontal para la detección y enumeración de enterobacterias).

Se realizó el procedimiento de toma de muestra indicado en el apartado 2.1. y una vez incorporada el agua de peptona tamponada (225 mL) se homogeneizó, se pipeteó un 1 mL a un tubo de 9 mL de agua destilada estéril y se realizaron las diluciones decimales seriadas.

Las diluciones se sembraron en profundidad en placa con medio VRBD (Ref. Merck 1.10275.0500) y se llevaron a incubación durante 48-72 horas a 37 °C. Finalmente después del tiempo destinado a la incubación se realizó el recuento de los microorganismos.

2.3 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* por métodos culturales

Para la detección de la especie *Escherichia coli* no existe un procedimiento estandarizado de referencia por presencia/ausencia en alimentos y por este motivo nuestro análisis se basó en diferentes normas ISO. Se basó en la norma ISO 21150, que tiene como objeto de aplicación la detección de *Escherichia coli* en productos cosméticos, en la norma ISO 9308-3 que especifica un método para detección y recuento en aguas superficiales y residuales y en la norma ISO 16654 que tiene como objeto de aplicación la detección de *Escherichia coli* O157, así como en las cuatro etapas de la Norma ISO 6579 para detección de *Salmonella* spp.

El protocolo consistió en cuatro etapas sucesivas; preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio líquido selectivo, siembra en placa en medios sólidos selectivos e identificación por pruebas bioquímicas.

En la primera etapa, el preenriquecimiento, se realizó la toma de muestra (apartado 2.1.) de los diferentes alimentos, se incorporó el agua de peptona tamponada y se incubó a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, a partir del cultivo obtenido, se realizó el

enriquecimiento en medio líquido selectivo. Para ello se sembró un tubo de caldo Lactosado Biliado Verde Brillante (Merck) y se incubó a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Al finalizar la incubación se procedió a la tercera etapa, la siembra en placa e identificación, sembrándose dos medios selectivos a partir del cultivo obtenido. Los medios escogidos fueron triptona-bilis-x-glucuronido (agar TBX, Ref. 01-619-500 Scharlau) y agar Endo (Ref. 01-589-500 Scharlau), y los dos, una vez sembrados, se incubaron a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Las colonias típicas de *Escherichia coli* que crecen en el agar TBX son de color azul y las colonias típicas que crecen en agar Endo son de color verde brillante.

Después de la incubación se examinaron las placas para identificar la presencia de colonias típicas y se procedió a la cuarta etapa, la identificación. Para ello se seleccionaron cinco colonias sospechosas de *Escherichia coli* de cada placa y se aislaron en placas de agar nutritivo, plate count agar. A partir de una de las colonias sospechosas se realizaron las pruebas bioquímicas, IMViC (Indol +, Rojo de Metilo + Voges-Proskauer - Citrato -) y tira API:

Batería IMViC (para descartar los aislamientos diferentes a los resultados +++-): Esta batería consiste en una serie de pruebas bioquímicas que se emplean fundamentalmente para la identificación de enterobacterias. Concretamente son cuatro pruebas y se realizaron de la siguiente forma:

Prueba del indol:

Se sembró una colonia sospechosa en un tubo que contenía 5 mL de medio de caldo triptófano (Ref. Merck 1.10694.0500) y se incubó a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Después de la incubación se añadió 1 mL del reactivo Kovacs y se interpretaron los resultados: hay producción de indol, prueba positiva, si hay una formación de un anillo rojo y negativos si hay una formación de un anillo amarillo- marrón. En el caso de *E. coli* la prueba debe ser positiva.

Rojo de metilo y Voges-Proskauer:

Estas dos pruebas se utilizan para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa por la vía ácido mixta (producción de ácido) o por la vía butanodiólica (producción de acetoína).

Para realizarla se utilizó el mismo medio de cultivo, el caldo rojo de metilo-Voges-Proskauer (Ref. 1.05712.0500). Se suspendió el contenido de un asa de la colonia sospechosa en un tubo estéril que contenía 6 ml de este y se incubó a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Después del periodo de incubación se dividió el contenido en dos tubos y se realizaron las pruebas por separado.

Por un lado en el primer tubo se realizó la prueba del rojo de metilo, la cual tiene como objetivo determinar si se produce formación de ácidos y para *E.coli* debe ser positiva. Para ello se añadió rojo de metilo, un indicador de pH que actúa entre 4,2 (rojo) y 6,3 (amarillo) y se interpretaron inmediatamente los resultados donde se consideró un cambio de color a rojo como prueba positiva.

Por otro lado en el segundo tubo se realizó la prueba de Voges-Proskauer, la cual tiene como objetivo determinar si se produce formación de acetoína y para *E.coli* debe ser negativa. Para ello se añadió dos gotas de KOH y dos gotas de α -naftol y se interpretaron inmediatamente los resultados donde se consideró un cambio de color a rojo como prueba positiva.

Citrato:

La prueba del citrato se utiliza para determinar si un microorganismo es capaz de crecer con citrato como única fuente de carbono. Para ello se utiliza el agar Citrato de Simmons (Ref. 01-177-500, Scharlau), que contiene citrato de sodio, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador de pH.

Para realizarla se sembró la superficie en estría, se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas y después del periodo de incubación se interpretaron los resultados.

Los resultados se consideraron positivos si el medio había virado a color azul, y se consideraron negativos, como en *E. coli* si no había virado.

Tira API 20 E de los IMViC positivos ++--

La tira API (batería miniaturizada API 20 E, Biomerieux) es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram (-).

Consiste en 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados que luego se compararan con una base de datos. Para realizar esta prueba en primer lugar se sembró una colonia sospechosa en 6 mL de agua destilada. Después se rellenaron los pocillos de la tira con la suspensión del cultivo como indicaba las instrucciones del fabricante y se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ °C durante 24 h.

Para leer los resultados se siguieron las instrucciones en lo que respecta a los reactivos y finalmente se comparó con la base de datos de Biomerieux.

Las cepas aisladas de *E. coli* se conservaron en crioviales a -40 °C hasta su posterior utilización.

2.4. Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. por métodos culturales

El análisis de las muestras se realizó basándonos en la Norma ISO 6579 (Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.) y como indica la norma se realizaron cuatro etapas sucesivas; preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en dos medios líquidos selectivos, siembra en placas de dos medios de agar selectivo e identificación por pruebas bioquímicas.

Para llevar a cabo la primera etapa, el preenriquecimiento, en primer lugar se realizó la toma de muestra (apartado 2.1.) de los diferentes alimentos y una vez incorporada el agua de peptona tamponada se incubó a 37 °C ± 1 °C durante 18 ± 2 horas.

Tras el periodo de incubación, a partir del cultivo obtenido, se realizó el enriquecimiento en medio líquido selectivo y para ello se sembraron un tubo de Rappaport Vassiliadis (Ref. 218581, BD), con soja y un tubo de Muller-Kauffmann tetratonato novobiocina (Ref. 02-033, Scharlau). Los dos se incubaron durante 24 ± 3 horas, el Rappaport Vassiliadis a 42 ± 1 °C y el Muller-Kauffmann tetratonato novobiocina a 37 ± 1 °C.

Al finalizar la incubación se procedió a la tercera etapa, la siembra en placa e identificación y para ello se sembraron dos medios selectivos a partir del cultivo obtenido. Uno de los medios, agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD, Ref. 02-033, Scharlau), era el indicado por la norma y como medio selectivo complementario se eligió un agar cromógeno de *Salmonella* (Oxoid). Los dos se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas.

Después de la incubación se examinaron las placas para identificar la presencia de colonias típicas y se procedió a la cuarta etapa, la identificación. Las colonias típicas de *Salmonella* que crecen en el agar XLD son transparentes de color rojizo con o sin un centro negro y las colonias típicas que crecen en agar cromógeno de *Salmonella* son de color rosa-rojo.

Se seleccionaron cinco colonias sospechosas de *Salmonella* de cada placa y se aislaron en placas de agar nutritivo, que en nuestro caso fueron de plate count agar. Finalmente a partir de una colonia aislada en el agar nutritivo, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

Batería IMViC (para descartar los aislamientos diferentes a los resultados -++): Esta batería consiste en una serie de pruebas bioquímicas que se emplean fundamentalmente para la identificación de enterobacterias. Concretamente son cuatro pruebas y se realizaron de la siguiente forma:

Prueba del indol:

Se sembró una colonia sospechosa en un tubo que contenía 5 mL de medio de triptona/triptófano y se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Después de la incubación se añadió 1 mL del reactivo Kovacs y se interpretaron los resultados: hay producción de indol, prueba positiva, si hay una formación de un anillo rojo y negativos si hay una formación de un anillo amarillo- marrón. En el caso de *Salmonella* la prueba debe ser negativa.

Rojo de metilo y Voges-Proskauer:

Estas dos pruebas se utilizan para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa por la vía ácido mixta (producción de ácido) o por la vía butanodiólica (producción de acetoina).

Para realizarla se utilizó el mismo medio de cultivo, el caldo rojo de metilo-Voges-Proskauer. Se suspendió el contenido de un asa de la colonia sospechosa en un tubo estéril que contenía 6 ml de este y se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Después del periodo de incubación se dividió el contenido en dos tubos y se realizaron las pruebas por separado.

Por un lado en el primer tubo se realizó la prueba del rojo de metilo, la cual tiene como objetivo determinar si se produce formación de ácidos y para *Salmonella* debe ser positiva. Para ello se añadió rojo de metilo, un indicador de pH que actúa entre 4,2 (rojo) y 6,3 (amarillo) y se interpretaron inmediatamente los resultados donde se consideró un cambio de color a rojo como prueba positiva. Por otro lado en el segundo tubo se realizó la prueba de Voges-Proskauer, la cual tiene como objetivo determinar si se produce formación de acetoina y para *Salmonella* debe ser negativa. Para ello se añadió dos gotas de KOH y dos gotas de α -naftol y se interpretaron inmediatamente los resultados donde se consideró un cambio de color a rojo como prueba positiva.

Citrato:

La prueba del citrato se utiliza para determinar si un microorganismo es capaz de crecer con citrato como única fuente de carbono. Para ello se utiliza el agar Citrato de Simmons, que contiene citrato de sodio, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador de pH.

Para realizarla se sembró la superficie en estría, se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas y después del periodo de incubación se interpretaron los resultados.

Los resultados se consideraron positivos si el medio había virado a color azul, este sería el caso de posible *Salmonella*, y se consideraron negativos si no había virado.

Agar TSI (de los resultados positivos en IMViC --++)

Para sembrar el agar Triple Agar Sugar (TSI) se sembró en estría la superficie y en picadura la parte profunda. Una vez sembrado se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas y tras la incubación se interpretaron los resultados.

Según la norma ISO 6579 los cultivos típicos de *Salmonella* son positivos si la parte inclinada es roja (sin utilización de lactosa y/o sacarosa) y la parte profunda amarilla (utilización de la glucosa). Además, en un 90 % de los casos aproximadamente, va acompañado con formación de gas y formación de sulfuro de hidrógeno (ennegrecimiento del agar).

Tira API 20 E (de los TSI positivos)

La tira API (batería miniaturizada API 20 E) es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram (-).

Consiste en 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados que luego se compararan con una base de datos. Para realizar esta prueba en primer lugar se sembró una colonia sospechosa

en 6 mL de agua destilada. Después se rellenaron los pocillos de la tira con la suspensión del cultivo como indicaba las instrucciones del fabricante y se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Para leer los resultados se siguieron las instrucciones en lo que respecta a los reactivos y finalmente se comparó con la base de datos de Biomerieux.

3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *E.coli* y *Salmonella* spp. EN ALIMENTOS POR PCR

3.1. Cepas de referencia

En este estudio se utilizaron 2 cepas de referencia procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *Salmonella enterica* 4266 y *Escherichia coli* 101.

3.2. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el kit GenElute (Sigma-Aldrich-Merck), siguiéndose las instrucciones del fabricante para microorganismos Gram negativos.

Se realizaron extracciones del DNA de las cepas de referencia, de las cepas aisladas en las muestras de alimentos, de alícuotas de preenriquecimientos y de enriquecimientos tras su incubación.

3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa: PCR múltiple

Para la realización de este trabajo se revisaron varias citas bibliográfica sobre las condiciones desarrolladas por otros autores para identificar y detectar especies de *E. coli* y *Salmonella* spp. con una PCR múltiple (mPCR), y se decidió seguir la técnica descrita por Kim y col. en 2006.

Para la identificación y detección de *Escherichia coli* se utilizaron los iniciadores GADA/BF (5'-ACCTGCGTTGCGTAAATA-3') y GADA/BR (5'-GGGCGGGAGAAGTTGATG-3') que amplifican un fragmento de 670 pb de DNA cromosómico (McDaniels y col., 1996). Para la identificación y detección de *Salmonella* spp. los iniciadores que se utilizaron fueron SalinvA139 (5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA-3') y SalinvA141 (5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'), que amplifican un fragmento de 284 pb de DNA cromosómico (Rahn y col., 1992).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 29 μ L, que contenía 25 μ L de mezcla y 4 μ L de DNA molde (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos para la detección de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en la mPCR

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 x
MgCl ₂	3 mM
dNTPs	0,2 mM/cada
SalinvA139 (<i>Salmonella</i> spp.)	0,2 μ M
SalinvA141 (<i>Salmonella</i> spp.)	0,2 μ M
GADA/BF (<i>Escherichia coli</i>)	0,4 μ M
GADA/BR (<i>Escherichia coli</i>)	0,4 μ M
Taq polimerasa	2,5 U

Las condiciones de temperatura y tiempo, la mPCR se llevó a cabo en un termociclador según los ciclos de temperatura y tiempo descritos por Kim y col. en 2006 (Tabla 2.).

Tabla 2. Condiciones utilizadas en la mPCR de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Fases	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94°C	2 minutos
Desnaturalización		94 °C	30 segundos
Unión de los cebadores	35	55 °C	30 segundos
Extensión		72 °C	60 segundos
Extensión final	1	72°C	7 minutos

Se utilizó el DNA de las cepas *Salmonella entérica* 4266 y *Escherichia coli* 101 como control positivo y como control negativo se reemplazó el DNA por agua estéril.

Finalmente los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1x y Red Safe al 5%. Se utilizó un voltaje de 90V durante una hora y se visualizaron mediante un transiluminador con luz UV.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de **44** muestras de alimentos y aguas: 11 muestras de carne de pollo (fiambre, hamburguesa y pechuga), 11 muestras de vegetales (lechuga, espinacas y acelgas), 15 muestras de queso fresco y 7 muestras de agua.

1. RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS

Algunas de las especies que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* tienen un origen fecal y su presencia en alimentos frescos, como vegetales, o en alimentos de origen animal puede indicar una manipulación o un almacenamiento con unas medidas higiénicas inadecuadas. Actualmente el recuento de enterobacterias no considera como indicador de presencia de patógenos pero sí se considera como un buen indicador higiene. Por este motivo se realizaron recuentos de enterobacterias para los diferentes grupos de alimentos estudiados en este trabajo (carne, vegetales y queso) y para las muestras de agua.

Se siguió el protocolo detallado en la norma ISO 21528/2:2004 (Método horizontal para la detección y enumeración de enterobacterias) y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del recuento de enterobacterias

Muestra	Origen muestra	Recuento enterobacterias
Carne de pollo	Supermercado A	$6,8 \times 10^4$ UFC/g
Carne de pollo	Supermercado B	$1,66 \times 10^5$ UFC/g
Espinacas	Comercio A	$> 5,7 \times 10^3$ UFC/g
Acelgas	Supermercado B	$8,5 \times 10^5$ UFC/g
Queso	Supermercado B	$> 7,3 \times 10^6$ UFC/g
Agua	De riego	$7,5 \times 10^2$ UFC/mL
Agua de pozo	De pozo	$8,3 \times 10^2$ UFC/mL

En los resultados de los recuentos observamos una gran diferencia entre los alimentos adquiridos en el supermercado B y en los adquiridos en comercio A. El supermercado B debería mejorar la higiene en la manipulación o en el origen de las materias primas con tal de no poner en riesgo la salud de los consumidores.

Para al agua de riego y agua de pozo el recuento no es muy elevado y no se observa apenas diferencia en los resultados. Y en el caso de espinacas, comparando con las demás muestras, se da la mejor calidad en higiene. Por tanto se podría concluir que las medidas higiénicas en el comercio A son aceptables, mientras que las muestras del supermercado B presentan recuentos muy altos.

2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* POR MÉTODOS CULTURALES

Siguiendo el protocolo establecido en el apartado 2.3. de materiales y métodos se analizó la presencia de *Escherichia coli* en las muestras de alimentos y agua. El número de aislados fue un total de 21 cepas en el 38,63 % de las muestras.

Se utilizaron dos medios de aislamiento selectivo, agar TBX y agar Endo con el objetivo de determinar cuál de los dos era más eficaz para aislar el microorganismo.

Respecto a los diferentes alimentos, en carne se obtuvo un porcentaje de prevalencia del 45,45 % (tabla 4) con un porcentaje del 62,5 % para Endo y un 37,5 % para TBX.

Cabe destacar que en fiambre, a diferencia de en la hamburguesa y en la pechuga, no se obtuvo ningún aislado de *Escherichia coli*, esto puede deberse al tratamiento térmico que se realiza durante su procesado y a la ausencia de recontaminación durante su manipulación.

Tabla 4: Resultados del aislamiento en carnes de *Escherichia coli* en medios selectivos

		Muestra	Endo	TBX
Carne	Fiambre	C1	-	-
		C2	-	-
		C3	-	-
	Hamburguesa	C4	-	-
		C5	-	-
		C7	-	-
		C9	+	-
		C6	+	+
	Pechuga	C8	+	-
		C10	+	+
		C11	+	+
		$\Sigma=$ 11	$\Sigma=$ 5	$\Sigma=$ 3

En lo que respecta a los vegetales de hoja fresca se obtuvo un porcentaje de prevalencia del 45,45 % (tabla 5). Este porcentaje fue ligeramente superior al reportado por Viswanathan y Kaur (2000) que fue del 31,9 % en vegetales de todo tipo y muy superior al reportado por Abadías y col. (2007) que solamente fue del 7 %. Y respecto a los medios selectivos observamos que no se han dado diferencias en los porcentajes de aislamiento.

Tabla 5: Resultados del aislamiento en vegetales de *Escherichia coli* en medios selectivos

		Muestra	Endo	TBX
Vegetales	Lechuga	V1	+	-
		V2	-	+
		V3	+	-
		V4	-	-
		V5	-	+
	Espinacas	V6	-	-
		V7	+	+
		V8	-	-
	Acelgas	V10	-	-
		V9	-	-
		V11	-	-
	$\Sigma=$ 11	$\Sigma=$ 3	$\Sigma=$ 3	

Al analizar el agua, obtuvimos como resultado un porcentaje del 85,71 %. Este resultado fue bastante elevado y se asemeja al presentado por Holvoet (2013) que fue del 75 %. El elevado porcentaje nos indica la posible contaminación fecal en el agua, debida sobre todo a la actividad agrícola. Y en lo que respecta a los medios utilizados en Endo se consiguió el doble de aislados.

Tabla 6: Resultados del aislamiento en agua de *Escherichia coli* en medios selectivos

		Muestra	Endo	TBX
Agua de riego	A1	+	-	
	A2	+	-	
	A3	-	+	
	A4	-	-	
	A5	+	-	
	A6	+	-	
	A7	-	+	
	$\Sigma=$ 7	$\Sigma=$ 4	$\Sigma=$ 2	

Finalmente en las 15 muestras analizadas de queso solamente detectamos la presencia de *Escherichia coli* en una muestra, obteniéndose un resultado de prevalencia del 6,66 % para este microorganismo y poniendo en relieve que los establecimientos donde se compró el queso tenían una buena higiene de manipulación y de origen de la muestras.

3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp. POR MÉTODOS CULTURALES

Se analizaron las 48 muestras de acuerdo a la norma ISO 6579 (Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.) con el objetivo de detectar e identificar *Salmonella*.

A pesar de que se obtuvieron colonias sospechosas en los medios de aislamiento selectivos (XLD y agar cromógeno de *Salmonella*) al realizarse las pruebas bioquímicas los resultados fueron negativos y por tanto no se confirmó la de presencia de este microorganismo.

Los resultados negativos supondrían que tanto para la carne de pollo (carne picada) como para los vegetales de hoja fresca se cumpliría el criterio microbiológico de seguridad alimentaria que establece ausencia en 25 gramos de muestra durante su vida útil. Y supondría también que el queso y el agua utilizados en este ensayo no son una fuente peligrosa de este microorganismo.

Estos resultados difieren mucho de otros autores como el elaborado por Dominguez y col. (2001) donde la prevalencia de *Salmonella* fue del 35,83 % en muestras de carne de pollo compradas en tiendas minoristas y supermercados, o como el elaborado por Capita y col. (2002) donde la prevalencia de *Salmonella* fue del 20 % para hamburguesas. Pero se asemeja a otros estudios donde la prevalencia de *Salmonella* fue baja como el elaborado por Kramarenko y col. (2014) en el que la detección solamente fue del 0,54 % en frutas y hortalizas frescas o el realizado por Little y col. (2007) donde no se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras de queso.

Por otro lado los resultados de este estudio indican que los diferentes alimentos y el agua no son una fuente potencial de *Salmonella* pero cabe destacar que la ausencia de resultados positivos puede deberse a diferentes factores. Puede deberse a que *Salmonella* se encontraba en pequeña concentración en las muestras y mediante los métodos culturales no se pueden detectar.

4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *E. coli* Y *Salmonella* spp. POR PCR MÚLTIPLE

4.1. Extracción de DNA

En este trabajo se planteó realizar la extracción de todos los 199 viales entre alícuotas de caldos de preenriquecimiento y enriquecimiento y cepas aisladas. Este total de muestras es la suma de 44 alícuotas de preenriquecimientos y 132 alícuotas de enriquecimientos incubados de muestras de agua (21), de carne (33), de vegetales (33) y de queso (45), de las cepas aisladas de *Escherichia coli* resuspendidas en 500 µL de tampón TE (21) y de las cepas de referencia, *Salmonella enterica* 4266 y *Escherichia coli* 101, resuspendidas 500 µL de tampón TE para control positivo de la PCR.

Para la presentación de este trabajo se han realizado un total de **72 extracciones de DNA**: 5 de preenriquecimientos, 58 de enriquecimientos (18 de vegetales, 11 de agua, 23 de carne, y 6 de queso), 5 de las cepas aisladas de *Escherichia coli* resuspendidas en 500 µL de tampón TE y dos repeticiones de las cepas de referencia, *Salmonella enterica* 4266 y *Escherichia coli* 101, resuspendidas 500 µL de tampón TE para control positivo de la PCR.

4.2. Reacción en cadena de la Polimerasa: PCR múltiple

En este trabajo se han realizado un total de 46 amplificaciones (de las 72 extracciones realizadas): a partir de 42 alícuotas de enriquecimiento, una de preenriquecimiento y 3 cepas aisladas de *E. coli*.

Para la puesta a punto de la PCR múltiple se han realizado varias repeticiones de amplificación de las cepas de referencia modificando diferentes concentraciones de reactivos: MgCl₂ (Figura 2) y dNTP (Figura 3). Nuestros resultados no muestran diferencias importantes con estas modificaciones, por lo que se debería continuar con esta línea para la puesta a punto de la técnica, ya que siguen sin presentar bandas únicas para cada microorganismo, como describen Kim y col. (2006).



Figura 2. Productos de amplificación de la PCR múltiple con diferentes concentraciones de $MgCl_2$: 1. *Salmonella enterica* 4266 (3 mM $MgCl_2$); 2. *Salmonella enterica* 4266 (4,5 mM $MgCl_2$); 3. *Escherichia coli* 101 (3 mM $MgCl_2$); 4. *Escherichia coli* 101 (4,5 mM $MgCl_2$).

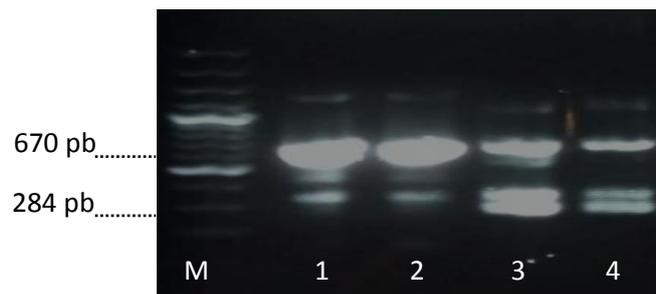


Figura 3. Productos de amplificación de la PCR múltiple con diferentes concentraciones de DNA y dNTP: M. Marcador de 100 pb; 1. *Salmonella enterica* 4266 (DNA 4 μL); 2. *Salmonella enterica* 4266 (DNA 2 μL); 3. *Escherichia coli* 101 (DNA 4 μL); 4. *Escherichia coli* 101 (DNA 2 μL).

En la Figura 4 se recogen los resultados de la amplificación de algunas de las muestras en las que se detectó la presencia tanto de *Escherichia coli*, como de *Salmonella* en alícuotas del enriquecimiento de agua queso y vegetales.

Y respecto a la alícuota utilizada de preenriquecimiento (Figura 4, calle 7) cabe destacar que se obtuvo un resultado positivo en la detección tanto de *Escherichia coli* como de *Salmonella*, ya que podemos observar cómo amplificó ambas bandas. Esto nos lleva a pensar que quizá no es necesario un enriquecimiento selectivo para detectar estos microorganismos.

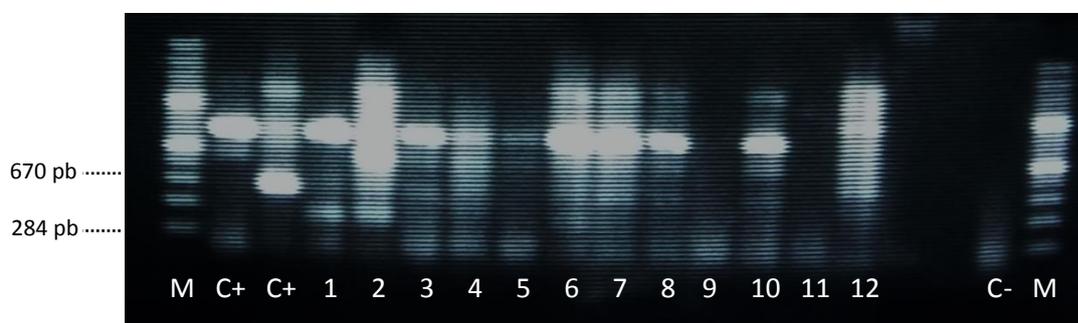


Figura 4. Resultados de amplificación por PCR múltiple. M. Marcador de 100 pb; C+. Control positivo de la cepa *Salmonella enterica* 4266; C+. Control positivo de la cepa *Escherichia coli* 101; 1. A3-CVB; 2. A3-TT; 3. A3-RV; 4. A5-CVB; 5. A5-TT; 6. A5-RV; 7. V7-APT; 8. V7-CVB; 9. V7-TT; 10. V7-RV; 11. Q5-RV; 12. Q6-RV; C-. Control negativo; M. Marcador de 100p.

5. VALORACIÓN CONJUNTA DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN

En este trabajo se ha intentado valorar la eficacia de los métodos culturales frente a los métodos moleculares, siempre con el objetivo de determinar si se pueden disminuir los días de duración del análisis y los recursos utilizados.

Las tablas 7 y 8 resumen la totalidad de los resultados para *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., obtenidos mediante los métodos convencionales y la técnica de PCR múltiple.

Tabla 7: Valoración conjunta de la detección de *Escherichia coli* por métodos culturales y moleculares por mPCR

		muestra	aislamiento <i>E. coli</i>	mPCR (CVB)
Carne	Pechuga	C3	-	+
		C6	+	+
		C8	+	+
		C9	+	+
		C10	+	+
	Hamburguesa	C11	+	+
Vegetales	Lechuga	V1	+	+
		V2	+	+
		V3	+	+
		V5	+	+
	Espinacas	V7	+	+
Queso	Fresco	Q14	+	+
Agua	De riego	A1	+	+
		A2	+	+
		A3	+	+
		A5	+	+

Al observar los resultados de las 16 muestras analizadas (Tabla 7), vemos que en todos los casos se ha confirmado con mPCR la presencia de *Escherichia coli* en las alícuotas del enriquecimiento, mientras que por métodos culturales no se ha podido aislar en la muestra C3.

Tabla 8: Valoración conjunta de la detección de *Salmonella* spp. por métodos culturales y moleculares por mPCR

		muestra	aislamiento <i>Salmonella</i>	PCR alícuota (TT)	PCR alícuota (RV)
Carne	Pechuga	C8	-	+	+
		C9	-	+	+
	Hamburguesa	C10	-	+	-
		C11	-	+	+
Vegetales	Lechuga	V1	-	+	+
		V2	-	+	+
	Espinacas	V5	-	-	-
		V7	-	-	+
Queso	Fresco	Q14	-	-	-
Agua	De riego	A1	-	+	+
		A2	-	+	-
		A3	-	+	-
		A5	-	-	+

Salmonella spp. no se ha aislado en ninguna muestra mediante métodos culturales, pero observamos que en 11 de las 13 muestras utilizadas sí se pudo detectar mediante PCR múltiple.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el método de PCR múltiple es más rápido y sensible que los métodos culturales pero cabe destacar que los resultados positivos podrían deberse a falsos positivos es decir a que se ha amplificado DNA de células muertas que se encontraban en la muestra. También es posible que el método cultural sea incapaz de detectar la presencia de estos microorganismos por no estar en las condiciones fisiológicas adecuadas. Por todo ello, se debería seguir investigando en esta línea.

V. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se han analizado un total de 44 muestras de alimentos y aguas: 11 muestras de carne de pollo (fiambre, hamburguesa y pechuga), 11 muestras de vegetales (lechuga, espinacas y acelgas), 15 muestras de queso fresco y 7 muestras de agua.
2. En las muestras estudiadas se han podido aislar 21 cepas de *Escherichia coli* en el 38,63 % de las mismas, esto demuestra la necesidad de seguir investigando la presencia de esta bacteria, ya que puede suponer un problema para la Salud Pública
3. El porcentaje de aislados de *Escherichia coli* en los diferentes alimentos fue de un 85,71 % para agua de riego, un 45,45 % para carne y vegetales y un 6,66 % en queso.
4. De los dos medios selectivos utilizados para el aislamiento de *Escherichia coli* en los diferentes alimentos, se ha observado mayor eficacia con el medio ENDO que con el medio TBX.
5. A pesar de que se obtuvieron colonias sospechosas en los medios de aislamiento selectivo (XLD y agar cromógeno de *Salmonella*) al realizarse las pruebas bioquímicas para su identificación, los resultados fueron negativos y por tanto no se confirmó la de presencia de este microorganismo por métodos culturales en ninguna muestra.
6. Se han realizado un total de 72 extracciones de DNA, de las cuales solamente se hay llegado a amplificar 46 extractos a partir de 42 alícuotas de enriquecimiento, una de preenriquecimiento y 3 cepas aisladas de *E. coli*, y dos repeticiones de las cepas de referencia, *Salmonella enterica* 4266 y *Escherichia coli* 101 para control positivo de la PCR.
7. Con la técnica de la PCR múltiple hemos conseguido identificar todos los aislados de *Escherichia coli* que se habían obtenido mediante los métodos culturales.
8. La técnica de la PCR múltiple para *Salmonella* spp. ha demostrado ser mucho más sensible que los métodos culturales para detectar su presencia en diferentes tipos de alimentos.
9. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el método de PCR múltiple es más rápido y sensible que los métodos culturales pero cabe destacar que los resultados positivos podrían deberse a falsos positivos es decir a que se ha amplificado DNA de células muertas que se encontraban en la muestra. También es posible que el método cultural sea incapaz de detectar la presencia de estos microorganismos por no estar en las condiciones fisiológicas adecuadas. Por todo ello, se debería seguir investigando en esta línea.

VI. BIBLIOGRAFÍA

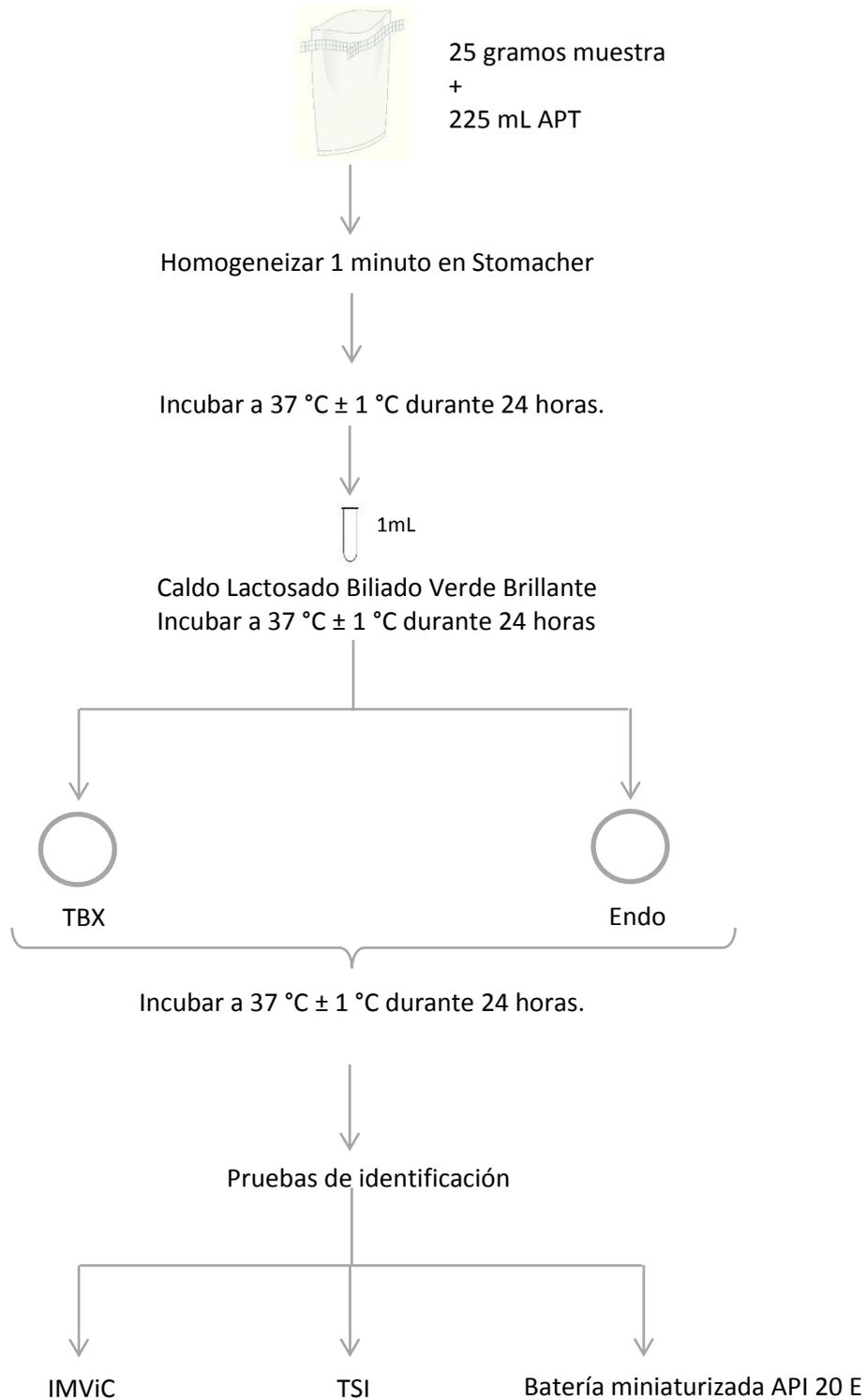
- ABADIAS M.; USALL J.; ANGUERA M.A.; SOLSONA C.; VIÑAS I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 121–129
- ADAMS M.R.; MOSS M.O. (1997). *Microbiología de los alimentos*. Ed: Acribia, Zaragoza.
- ALMIRANTE G.B. (2002). Infecciones por enterobacterias. Servicio de Enfermedades Infecciosas. *Medicine*, 8 (64): 3385-3397.
- ALTEKRUSE S.F.; COHEN M.L.; SWERDLOW D.L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (3): 285-293.
- BASTIDAS C.V. (2013). Impacto Social en 2011 del Síndrome Hemolítico Urémico en Alemania. *Trabajo final de ciclo*. Universidad politécnica de Valencia.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2015). Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica en 2014. *Sistema de Información Microbiológica*, 23 (5): 60-79.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2008). Vigilancia epidemiológica de brotes de transmisión hídrica en España 1999-2006. *Sistema de Información Microbiológica*, 16 (3): 25-36.
- CAPITA R.; ALVAREZ A.A.; CALLEJA C.A.; MORENO B.; GARCÍA F.M^a.C. (2003). Occurrence of *salmonellae* in retail chicken carcasses and their products in Spain International. *Journal of Food Microbiology*, 81: 169-173.
- DOMÍNGUEZ C.; GÓMEZ I.; ZUMALACÁRREGUI J. (2002). Prevalence of Salmonella and Campylobacter in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 165–168.
- EFSA, European Food Safety Authority; ECDC; European Centre for Disease Prevention and Control, (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14 (12): 4634.
- EUZÉBY J.P. (2013) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/> (última consulta 2 de junio 2017).
- FAO (2009). Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. *Boletín de servicios agrícolas de la FAO* nº 151. Roma.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; OMS Organización Mundial de la Salud (2009). Producción de alimentos de origen animal. *Codex alimentarius*. Roma.
- FORSYTHE S.J. (2003). *Alimentos seguros: microbiología*. Ed: Acribia, Zaragoza.
- JAY J.M.; LOESSNER M.J.; GOLDEN D.A. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed: Acribia, Zaragoza. 5^a Edición.
- KRAMARENKO T.; NURMOJA I.; KÄRSSIN A.; MEREMÄE K.; HÖRMAN A.; ROASTO M. (2014). The prevalence and serovar diversity of *Salmonella* in various food products in Estonia. *Food Control*, 42: 43-47.
- KIM J.; DEMEKE T.; CLEAR R.M.; PATRICK S.K. (2006). Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 111 (1): 21-5.
- LITTLE C.L.; RHOADES J.R.; SAGOO S.K.; HARRIS J.; GREENWOOD M.; MITHANI V.; GRANT K.; MCLAUCHLIN J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25: 304–312.

- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente (2017). Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas del 2014. Madrid.
- MCDANIELS A.E.; RICE E.W.; REYES, A.L.; JOHNSON, C.H.; HAUGLAND, R.A.; STELMA JR. (1996). Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -Dglucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3350.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2016). *Escherichia coli*. *Nota descriptiva*.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2015). Inocuidad de los alimentos. *Nota descriptiva n°399*.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2016). *Salmonella* no tifoidea. *Nota descriptiva*.
- PASCUAL A.M^a.R.; CALDERÓN P.V. (2013). *Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ed: Días de Santos, Madrid. 2^o Edición.
- RAHN K.; DE GRANDIS S.A.; CLARKE R.C.; MCEWEN S.A.; GALAN J.E.; GINOCCHIO C.; CURTISS R.; GYLES C.L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella enterica* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6: 271–279.
- RODRIGUEZ G.A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx*, 44 (5): 142-157
- SIM, Sistema de Información Microbiológica (2016). Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2015*. Madrid.
- SIM, Sistema de Información Microbiológica (2016). Centro nacional de epidemiología (2016). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. *Informe anual 2014*. Madrid.
- UNE-EN ISO (2003) Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002). Madrid
- VISWANATHAN P.; KAUR. R (2000). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203: 205-213.

VII. ANEXOS

1. Esquema para el análisis de *Escherichia coli* mediante métodos culturales

DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO



2. Esquema para el análisis de *Salmonella* spp. mediante métodos culturales

DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO

