

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

Desarrollo de un método rápido basado en la PCR a tiempo real para
recuento de *Escherichia coli* en leche cruda

presentado por

Alma Pérez de Ciriza López

Junio 2017

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

INDICE

1	RESUMEN.....	- 1 -
2	INTRODUCCIÓN	- 3 -
2.1	Importancia del estudio de <i>Escherichia coli</i> beta-glucuronidasa positivas en leche cruda	- 3 -
2.2	Taxonomía y características ecológicas	- 4 -
2.2.1	Patogenicidad	- 5 -
2.3	Principales alimentos de riesgo y fuentes de contaminación	- 5 -
2.4	LEGISLACIÓN	- 6 -
2.4.1	Normas ISO para la identificación de <i>E. coli</i>	- 6 -
2.4.2	Criterios microbiológicos.....	- 6 -
2.5	Métodos de recuento de <i>Escherichia coli</i>	- 7 -
2.5.1	Métodos convencionales	- 7 -
2.5.2	Métodos moleculares.....	- 8 -
3	OBJETIVO.....	- 13 -
4	MATERIAL Y MÉTODOS	- 14 -
4.1	Preparación de la suspensión de <i>E. coli</i>	- 14 -
4.2	Extracción del DNA.....	- 14 -
4.3	Cuantificación del DNA.....	- 14 -
4.4	Amplificación de DNA mediante PCR a tiempo real	- 15 -
4.4.1	Diseño de cebadores y sonda de fluorescencia.....	- 15 -
4.5	Optimización de las condiciones de amplificación para qPCR.....	- 16 -
4.5.1	Concentración de cebadores y comprobación de la especificidad con SYBR Green	- 16 -
4.5.2	Concentración de la sonda.....	- 18 -
4.6	Rango dinámico de concentración de DNA.	- 19 -
4.7	Curva de calibración celular.....	- 20 -
4.8	Curva de calibración en leche	- 21 -
4.9	Validación del método	- 22 -
5	. RESULTADOS.....	- 25 -
5.1	Optimización de las condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real ...	- 25 -
5.1.1	Concentración de cebadores y DNA con SYBR Green	- 25 -

5.1.2	Concentración de cebadores y DNA con sonda Taqman	- 26 -
5.2	Rango dinámico de concentración de DNA	- 27 -
5.1	Curva de calibración celular.....	- 27 -
5.2	Curva de calibración en leche	- 29 -
5.3	reproducibilidad y Repetibilidad	- 32 -
5.3.1	Reproducibilidad	- 32 -
5.3.2	Repetibilidad.....	- 33 -
6	CONCLUSIONES	- 34 -
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 35 -
	ANEJO 1: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	- 39 -
	Infusión de cerebro y corazón (BHI) y agar BHI.....	- 39 -
	Agua de peptona.....	- 39 -
	TBX (Brain Heart Infusion Broth)	- 39 -
	ANEJO 2: RESULTADOS DE PCR A TIEMPO REAL	- 40 -

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Criterios microbiológicos.</i>	- 7 -
<i>Tabla 2. Categorías de E. coli diarrogénicas.</i>	- 11 -
<i>Tabla 3. Características de los cebadores y sonda diseñados.</i>	- 15 -
<i>Tabla 4. Matriz de cebadores para el gen uidA ensayada con diferentes concentraciones de DNA.</i>	- 16 -
<i>Tabla 5. Volumen de los reactivos (µL) utilizados en la qPCR para la optimización de la concentración de los cebadores.</i>	- 16 -
<i>Tabla 6. Matriz de concentración de sonda para el gen uidA ensayada con diferentes concentraciones de DNA.</i>	- 18 -
<i>Tabla 7. Volumen de los reactivos (µL) utilizados en la qPCR para la optimización de la concentración de los cebadores.</i>	- 18 -
<i>Tabla 8. Valores medios de Ct, ± SD obtenidos a partir del DNA de E. coli.</i>	- 25 -
<i>Tabla 9. Valores medios de Ct, ± SD obtenidos a partir del DNA de E. coli.</i>	- 26 -
<i>Tabla 10. Eficiencias de amplificación en la PCR a tiempo real en el estudio del rango dinámico de concentración de DNA.</i>	- 27 -
<i>Tabla 11. Recuento de colonias Escherichia coli.</i>	- 28 -
<i>Tabla 12. Eficiencias de amplificación en la PCR a tiempo real.</i>	- 28 -
<i>Tabla 13. Recuento microbiológico de Escherichia coli en leche cruda mediante la norma ISO-16649.</i>	- 29 -
<i>Tabla 14. Eficiencia de amplificación PCR a tiempo real obtenidas para las muestras de la curva de calibración en leche.</i>	- 30 -
<i>Tabla 15. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real ensayada en leche cruda (n=6).</i>	- 32 -
<i>Tabla 16. Reproducibilidad del método de qPCR ensayada en leche cruda (n=9).</i>	- 32 -
<i>Tabla 17. Repetibilidad del método de PCR a tiempo real ensayada en leche cruda (n=3).</i>	- 33 -
<i>Tabla 18. Valores medios Cts ± SD obtenidos en las muestras de DNA utilizadas para realizar el rango dinámico.</i>	- 40 -
<i>Tabla 19. Concentración DNA curva estándar.</i>	- 40 -
<i>Tabla 20. Valores medios Cts ± SD obtenidos en las muestras de DNA utilizadas para realizar la curva celular.</i>	- 41 -
<i>Tabla 21. Valores medios Cts ± SD obtenidos en las muestras de DNA utilizadas para realizar la curva en leche.</i>	- 41 -

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. E.coli ATCC 25922 en agar TBX. Fuente (Laboratorios Conda, 2010).....</i>	<i>- 8 -</i>
<i>Figura 2. Curva de amplificación qPCR fases. Fuente (elaboración propia).....</i>	<i>- 9 -</i>
<i>Figura 3. Curva de disociación qPCR amplificación dímeros. Fuente: Elaboración propia.-</i>	<i>10 -</i>
<i>Figura 4. Mecanismo de acción sondas TaqMan. (Fuente: http://technologyinscience.blogspot.com.es/2013/05/#.WTqMv_nyjcs).....</i>	<i>- 11 -</i>
<i>Figura 5. Programa de amplificación utilizando como fluorocromo el SYBR Green. Fuente: Elaboración propia.</i>	<i>- 17 -</i>
<i>Figura 6. Elaboración del gel de agarosa para la electroforesis de DNA. Fuente: http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab6/prepare.html.....</i>	<i>- 17 -</i>
<i>Figura 7. Programa de amplificación utilizando como fluorocromo la sonda TaqMan. Fuente: Elaboración propia.</i>	<i>- 19 -</i>
<i>Figura 8. Ensayo curva de calibración celular. Fuente: Elaboración propia.</i>	<i>- 20 -</i>
<i>Figura 9. Ensayo curva de calibración celular en leche. Fuente: Elaboración propia.</i>	<i>- 21 -</i>
<i>Figura 10. Curva de disociación durante la qPCR.....</i>	<i>- 25 -</i>
<i>Figura 11. Electroforesis en gel agarosa del gen uidA de E .coli.</i>	<i>- 26 -</i>
<i>Figura 12. Curva estándar del Gen uidA mediante el uso de SYBR Green (verde) y sonda TaqMan (naranja).....</i>	<i>- 27 -</i>
<i>Figura 13. Curva de calibración celular obtenida a partir de la amplificación del gen uidA de E. coli.</i>	<i>- 28 -</i>
<i>Figura 14. Fotografías colonias E. coli siembra en profundidad.....</i>	<i>- 29 -</i>
<i>Figura 15. Curva de calibración en leche contaminada artificialmente.</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Figura 16. Curva de calibración celular y curva de calibración en leche.</i>	<i>- 31 -</i>
<i>Figura 17. Curvas de amplificación de las muestras artificialmente contaminadas.....</i>	<i>- 31 -</i>

1 RESUMEN

El hábitat natural de *Escherichia coli* es el tracto intestinal de humanos y animales y su presencia en un alimento indica generalmente una contaminación de origen fecal. Esta bacteria es un microorganismo marcador clásico de calidad higiénica y presencia de patógenos productos lácteos o el agua.

Para la industria agroalimentaria es de interés desarrollar métodos rápidos, seguros y económicos para la detección de microorganismos marcadores como *E. coli*. La utilización de metodologías basadas en el análisis del ADN empleando la PCR a tiempo real (qPCR) permite en pocas horas realizar el recuento de microorganismos con alta sensibilidad y especificidad.

El presente estudio tuvo como objetivo estandarizar una técnica de qPCR con sonda TaqMan para el recuento de *E. coli* en leche cruda. Se diseñaron cebadores para amplificar un fragmento del gen *uidA*, presente en el 97% de las cepas de *E. coli*. Se optimizó la qPCR para el recuento de *E. coli* en cultivo puro (curvas de calibración celular) y se evaluó la técnica en muestras de leche inoculadas experimentalmente (curva de calibración en leche).

El límite de cuantificación alcanzado fue de $7,3 \times 10^2$ u.f.c./mL, lo que se corresponde con 108 copias del genoma de *E. coli* en la reacción de qPCR, que mostró valores de eficiencia cercanos al 100% y un valor de Ct de $31,38 \pm 0,01$. Además, los valores del coeficiente de variación obtenidos en los estudios de repetibilidad (0,91%) y reproducibilidad (0,74%) del método fueron bajos, lo que demuestra la adecuada precisión del método

ABSTRACT

The principal habitat of *Escherichia coli* is the intestinal tract of humans and animals and it is typically spread by fecal-contaminated food or drinking water. *E. coli* is a classical indicator bacteria for hygienic quality and the possible presence of pathogens in dairy products and water.

For food industry, it is of interest to develop fast, safe and economical methods for the detection of indicator bacteria such as *E. coli*. In that respect, the use of methodologies based on DNA analysis using the real time PCR (qPCR) allows an enumeration of microorganisms in few hours with high sensibility and specificity.

The objective of the present study was to develop a DNA-based method for enumeration of *E. coli* in raw milk. For this purpose, the primers were designed to amplify a fragment of uidA gene, which is present in 97% of *E. coli* strains. Optimization of qPCR method for *E. coli* enumeration in pure culture was done (cellular calibration curve) and it was evaluated in milk samples experimentally inoculated with *E. coli* (milk calibration curve).

The results showed that the limit of quantification was 7.3×10^2 c. f. u/mL, which was comparable to 108 copies of *E. coli* genome in qPCR reaction. The reaction efficiency was close to 100% and the Ct values were 31.38 ± 0.01 . Moreover, the coefficient of variation of Ct values obtained by qPCR were low, being 0.91% on the same day (repeatability) and 0.74% on different days (reproducibility), indicating that the method developed is precise.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE *ESCHERICHIA COLI* BETA-GLUCURONIDASA POSITIVAS EN LECHE CRUDA

Los alimentos son ecosistemas con un alto grado de complejidad, presentan diversos factores intrínsecos (inherentes al alimento) como las características químicas, físicas y bioquímicas de los mismos, y factores extrínsecos, que influyen en el crecimiento y presencia de determinados microorganismos (Doyle, Beuchat, & Montville, 2001). Existen numerosos estudios que demuestran que las enfermedades transmitidas por los alimentos son un peligro para la salud pública en todo el mundo y que continúan siendo una causa de morbilidad pese a que en la mayor parte de los casos estas enfermedades son leves y se no encuentran asociadas a síntomas gastrointestinales agudos (R. A. Herrera & González, 2006).

En la actualidad, es factible la determinación directa de la mayoría de los microorganismos patógenos entéricos, aunque para la industria agroalimentaria es poco práctico analizar un amplio rango de ellas. Es por ello que el uso de los microorganismos marcadores continúa siendo útil en la comprobación de la calidad de los alimentos, ya que su presencia en los alimentos puede señalar presencia simultánea de las bacterias patógenas ecológicamente relacionadas y además su detección es más fácil, rápida, segura y económica que la de estos últimos (Del Pilar et al., 2005; Tortorello, 2003).

Los microorganismos indicadores más utilizados en alimentos o aguas destinadas a consumo son las bacterias de origen fecal, siendo las bacterias coliformes pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae* más empleadas (Larrea, Rojas, Romeu, Rojas, & Pérez, 2013). Están subdivididos en dos grandes grupos, los coliformes totales y termotolerantes. Se definen como bacterias aeroanaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas. Son capaces de fermentar la lactosa produciendo ácido y gas cuando son incubadas durante 48 h a 35°C y presentan una reacción positiva a la β -D galactosidasa (Romeu, 2012). Los coliformes termotolerantes, presentan dos diferencias con respecto al resto de coliformes: son indol positivos y tienen la capacidad de crecer a 45 °C. Éstos son considerados como uno de los mejores indicadores de la calidad e higiene de los alimentos (Larrea et al., 2013).

El grupo de coliformes termotolerantes está formado por los Generos *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (Romeu, 2012). Durante muchos años se han utilizado las bacterias coliformes como indicadores de contaminación fecal. Sin embargo, su origen puede ser fecal y/o ambiental, por lo que para obtener resultados más fiables del origen de la contaminación, se ha realiza el recuento de otras bacterias fecales más específicas, como es *Escherichia coli*.

E. coli es considerado como uno de los microorganismos indicadores más válidos en la evaluación higiénica de alimentos crudos o productos que no han sido sometidos a tratamientos intensos de calor (Nore, Ximena, Sanchez, & Alexandra, 2008). Dentro de la Familia *Enterobacteriaceae*, se diferencia por la capacidad para la producción de la enzima β -glucuronidasa, exclusiva de esta especie bacteriana. Este microorganismo tiene un origen casi exclusivamente fecal y se encuentra íntimamente relacionado con bacterias patógenas como *Salmonella* (Alcalde, 2012; Jay, 1992).

Esta bacteria se encuentra comúnmente dentro de los organismos hospedadores. Cuando se expone a condiciones ambientales adversas, como falta de nutrientes, ambientes templados o pH

extremos, presenta dificultad para realizar la división celular, lo que indicaría que su presencia en un alimento es consecuencia de una contaminación fecal reciente (Larrea et al., 2013).

En la leche cruda, la presencia de los microorganismos indicadores describe el buen funcionamiento de la explotación ganadera. Si se encuentran en niveles elevados señalan una deficiencia en la manipulación de la materia prima o un incumplimiento en las pautas de higiene, llevando consigo una reducción de la calidad de la leche desde el punto de vista productivo y de seguridad alimentaria (Signorini et al., 2008).

El recuento de *E. coli* en la leche cruda a través de nuevas técnicas más rápidas y fiables ayudaría a conocer las condiciones higiénicas de la misma durante las diferentes etapas del proceso. Así, se podrían identificar los puntos críticos y tomar decisiones para poder corregir las posibles deficiencias en los procesos (Signorini et al., 2008).

2.2 TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS

La clasificación taxonómica de *E. coli* es la siguiente (Prescott, Harley, & Klein, 2004):

- Dominio Bacteria
 - Phylum *Proteobacteria*
 - Clase γ -proteobacterias
 - Orden *Enterobacteriales*
 - Familia Enterobacteriaceae
 - Género *Escherichia*

Dentro de este género hay 8 especies diferentes: *E. adecarboxylata*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. marmotae* y *E. vulneris*. («DSMZ: Prokaryotic Nomenclature Up-to-date», 2016).

E. coli es un bacilo Gram negativo y aeroanaerobio facultativo. Puede crecer en presencia y en ausencia de oxígeno o en ausencia del mismo a través de la fermentación de glucosa, utilizando el NO₃, NO₂ o el fumarato como receptores de electrones finales en los procesos respiratorios. Así mismo, fermenta azúcares como la lactosa, fructosa, galactosa, etc. y puede metabolizar la sacarosa, rafinosa, salicina o la glicerina, aunque no en todos los casos (Dos Santos, 2007).

Es una bacteria no esporógena, quimioheterótrofa y se caracteriza bioquímicamente por ser catalasa positiva, oxidasa, citrato ureasa y SH₂ negativa (Dos Santos, 2007; Otero, 2014). Tienen un tamaño medio de 1,1-1,5 μ m de ancho y 2,0-6,0 μ m de largo y son inmóviles o móviles (por la presencia de flagelos periticos) (Lázaro, 2009).

Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 37 - 42°C, aunque hay cepas que pueden llegar a crecer a una temperatura de 7°C o 46°C (Dos Santos, 2007; Otero, 2014). El pH óptimo se encuentra entre 5,5 – 8,0, aunque algunas cepas pueden llegar a multiplicarse en valores de 2,0 a 3,0 (Otero, 2014). *E. coli* es capaz de crecer en ambientes con una actividad de agua de 0,96, siendo un valor de 0,995 el óptimo para su crecimiento (ELIKA, 2013). Sin embargo, la concentración elevada de NaCl (>6 %) disminuye e incluso inhibe su capacidad de multiplicación (Dos Santos, 2007).

El hábitat normal de *E. coli* es el colon de mamíferos y aves, se estima que un organismo sano excreta diariamente entre 10^8 - 10^9 ufc de *E. coli* a través de las deposiciones, de ahí su relación directa con la contaminación fecal de los alimentos (Larrea et al., 2013; Souza et al., 2001). Cuando se encuentra en el organismo hospedador crece y se divide rápidamente (A. Herrera, 2015).

2.2.1 Patogenicidad

La mayor parte de las cepas de *E. coli* que se encuentran dentro de la flora habitual del intestino no presentan un riesgo para la salud. Muchas de ellas pueden sintetizar cofactores como la vitamina K, proteger al hospedador de invasiones de otros microorganismos patógenos, además de procesar algunos de los residuos alimentarios y aportar nutrientes esenciales para el epitelio intestinal (A. Herrera, 2015; Martín, 2017; Todar, 2008). En cambio, existen grupos patógenos de *E. coli* que son perjudiciales para los humanos (Farfán, Ariza, Vargas, & Vargas, 2016).

Las cepas de *E. coli* patógenas se clasifican atendiendo a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico en: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica, enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). El serotipo O157:H7 de las *E. coli* enterohemorrágicas es una de las cepas patógenas predominantes y conocida por ser el responsable de un gran número de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial (Pennington, 2010). Muchos brotes se han asociado con el consumo de carne poco cocida, aunque también de lechuga, leche no pasteurizada o agua potable. Además, la cepa hipervirulenta O104:H4 de la *E. Coli* enteroagregativa fue la responsable de un reciente brote en Alemania en 2001 causando aproximadamente 3.500 infecciones y hasta 50 muertes en humanos, aunque es una cepa atípica y con una menor incidencia que la O157:H7 (Blanco, 2012).

2.3 PRINCIPALES ALIMENTOS DE RIESGO Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN

La principal fuente de contaminación de *E. coli* son las heces del ganado bovino y ovino, aunque otros animales como las cabras, los cerdos, los caballos, las aves de corral, los perros y los gatos pueden ser también portadores.

Por lo tanto, los principales alimentos de riesgo son la carne cruda/mal elaborada (carne fermentada, carne picada mal cocinada, etc.) y los productos lácteos no pasteurizados (queso, leche, etc.). Además, los zumos de frutas no pasteurizados y las hortalizas crudas (semillas germinadas, lechuga, espinaca, melones, hongos, etc.) también pueden ser de riesgo por la contaminación de sus ecosistemas (FAO, 2012).

La contaminación del alimento puede ocurrir de forma directa (en las explotaciones ganaderas o canales contaminadas por falta de higiene) o por contaminación cruzada durante el crecimiento y cultivo (hortalizas por el uso de agua contaminada), en los procesos de manipulación, postcosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimento durante su preparación. Por otra parte, el control inadecuado de los parámetros de procesamiento como la temperatura de cocción, el pH, actividad de agua o el almacenamiento a altas temperaturas son factores que contribuyen a la persistencia de la bacteria.

La presencia de *E. coli* en leche cruda puede provenir de dos fuentes de contaminación: a través de contaminación cruzada por utensilios y superficies utilizadas en el ordeño o bien, como consecuencia de una mastitis o reacción inflamatoria de la glándula mamaria a través de la sangre o de la ubre directamente (Frazier & Westhoff, 1993; Verraes et al., 2015).

En relación a la incidencia de *E.coli* en la leche, varias cepas han aislado con frecuencia de leche cruda de vaca, con tasas de contaminación comprendidas entre el 1 y el 33,5%. En la UE, en 2012 se notificaron 5671 casos de infecciones alimentarias ocasionadas por esta bacteria (Bhat et al., 2007).

En la revisión bibliográfica realizada por Claeys et al (2013) se estudió el riesgo y beneficio asociado al consumo de leche de vaca cruda, identificando los principales microorganismos patógenos presentes en la leche cruda. Los datos del informe indicaban una prevalencia de *E.coli* en un rango de 0 - 35% en las muestras analizadas, llegando hasta un valor de 89,8% en estudios realizados en Francia (Ferrús, Barat, Conchello, Guix, & Palop, s. f.).

2.4 LEGISLACIÓN

2.4.1 Normas ISO para la identificación de *E. coli*.

La legislación referente a la enumeración de *E. coli* β -D-glucuronidasa positivas (norma ISO 16649) es aplicable a productos destinados al consumo humano o animal y a muestras ambientales recogidas en el área de producción y de manipulación de alimentos.

La norma UNE-ISO 16649 se conoce bajo el título general *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Método horizontal para la detección de Escherichia coli β -glucuronidasa positivas* y está constituida por las siguientes tres partes:

- **Parte 1: Técnica de recuento de colonias a 44°C utilizando membranas y 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-glucurónido.**

Este método se basa en la detección de *E. coli* mediante el uso de una membrana. Consta de una resucitación de las bacterias y su posterior inoculación con 1 mL en membranas de bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-glucurónido, las cuales se encuentran sobre una placa de petri con el medio "Minerals Modified Glutamate Medium". Se inocula tanto la muestra preparada como las diluciones (si son necesarias). Las placas reposan 15 minutos y se incuban a 37°C - 4 horas. Las membranas se transfieren un medio selectivo (TBX) y se incuban a 44°C durante 18 - 24 horas. Tras ello se cuentan las colonias positivas.

- **Parte 2: Colonias a 44°C utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-glucurónido.**

Este método se basa en la siembra en profundidad de la muestra por duplicado en medio de cultivo TBX y su posterior incubación a una temperatura de 44°C durante 18 - 24 horas. Tras ello se realiza el recuento de las colonias.

- **Parte 3: Técnica del Número Más Probable utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol beta-D-glucoronato.**

Se basa en el recuento de *Escherichia coli* positiva para β -glucuronidasa a través de cultivo en medio líquido, confirmación en un medio selectivo y el cálculo mediante el número más probable tras una incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y posteriormente a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ (Higiene ambiental, 2015).

2.4.2 Criterios microbiológicos

El Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 regula los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios: Dicho reglamento no establece un límite microbiológico máximo en relación a la *E. coli* en leche cruda, pero indica los criterios a cumplir en los derivados lácteos a partir del mismo, como son el queso, la mantequilla y la nata (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios microbiológicos.

	Alimento	Límite microbiológico máximo	Fase en la que se aplica
Criterios de higiene de los procesos	Queso hecho a base de leche o suero sometido a tratamiento térmico.	100– 1000 u.f.c/g ISO 16649-1 o 2	Final proceso de fabricación.
	Mantequilla y nata hechas a base de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasteurización.	10 - 100 u.f.c/g ISO 16649-1 o 2	Final proceso de fabricación.

Fuente: Reglamento (CE) n° 2073/2005.

2.5 MÉTODOS DE RECUENTO DE *ESCHERICHIA COLI*.

2.5.1 Métodos convencionales

Como consecuencia del impacto que tienen los microorganismos sobre la salud, y el importante papel que juegan los alimentos en la transmisión de los mismos se han desarrollado muchas metodologías para la identificación de los mismos. Convencionalmente la mayor parte de las técnicas desarrolladas estaban basadas en las características fenotípicas de las bacterias, como son las características microscópicas, macroscópicas, cultivos en placas, pruebas bioquímicas o pruebas basadas en la resistencia a ciertas sustancias (Fernández, García de la Fuente, Saéz, & Valdezate, 2010). Pese a que muchas de ellas se siguen aplicando de forma simultánea o secuencial en los protocolos estandarizados de los laboratorios para el análisis de los microorganismos patógenos o alterantes, los métodos habituales están basados en identificación en medios de cultivo. Se basan en la identificación de las bacterias en medios de cultivo bajo características morfológicas y fisiológicas en las que las condiciones ambientales o genéticas juegan un papel muy importante.

En la actualidad los métodos estandarizados y regulados para el análisis y control de los alimentos se basan en estas metodologías (ISO-16649).

Para el recuento de *E. coli* se utilizan medios selectivos, en los que se favorece el crecimiento de estas bacterias y se inhibe el de la flora acompañante. Además, los medios de cultivo son suplementados con sustancias nutritivas y condiciones de pH y temperatura de incubación adecuadas para el asegurar el crecimiento de los microorganismos de interés.

Los medios selectivos más utilizados para *E. coli* son los diferenciales, en los que se incorporan sustancias que permiten la diferenciación de las colonias por su aspecto característico. Algunos de los medios de cultivo más utilizados en el análisis y control de *E. coli* son (Lizzi & Herrera, 2011): la Triptona Bilix X-Glucorónico (TBX), el agar MacConkey, el agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) de Levine y el agar Cromogénico *E. coli*.

TBX (Tryptona Bilis X-Glucurónico), Agar

E.coli se caracteriza por tener la enzima β -D-glucuronidasa en la mayor parte de sus cepas, enzima que es capaz de degradar el compuesto X- β -D-glucuronide (5-Bromo-4 chloro-3indolyl- β -D-glucuronide), dando lugar a colonias de un color azul verdoso.

Las sales biliares del medio y la temperatura a la que se incuba (44°C) permiten la inhibición de las bacterias Gram positivas que pueda haber (Cultimed, 2017).

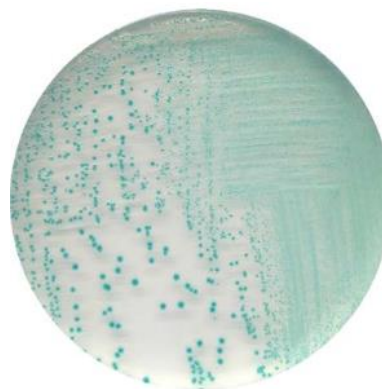


Figura 1. *E.coli* ATCC 25922 en agar TBX.
Fuente (Laboratorios Conda, 2010).

2.5.2 Métodos moleculares

Los métodos de análisis han ido evolucionando en los últimos años, han surgido nuevas técnicas para la identificación de patógenos en base a su DNA. Estos procedimientos presentan una serie de ventajas en comparación con los análisis convencionales usados hasta ahora. Son técnicas más específicas (detectan únicamente la molécula o el microorganismo de interés), muchas de ellas tienen mayor sensibilidad, son análisis rápidos (pueden identificar el microorganismos en menos de 24 horas) y están muy automatizadas, lo que facilita el manejo de grandes volúmenes de muestras (Palomino & González, 2014). No solo son más específicas o rápidas, sino que han ayudado cubrir algunas de las necesidades que tenían los métodos microbiológicos, como la alta variabilidad fenotípica dentro de una misma especie, la incapacidad de cultivar determinados microorganismos en medios artificiales, la baja actividad en pruebas bioquímicas o el cambio constante de muchas de las cepas como consecuencia de su capacidad de adaptación a nuevos entornos (Fernández et al., 2010; Palomino & González, 2014).

- **PCR a tiempo real**

La PCR convencional es una técnica de análisis que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años ochenta y se basa en la actividad de la DNA polimerasa, la cual es capaz de sintetizar una cadena de DNA a partir de una existente a través de la repetición cíclica de tres etapas (Monllor, 2013).

La PCR a tiempo real o qPCR es una evolución de la PCR convencional, que además de amplificar y detectar un fragmento de DNA también permite cuantificarlo. Los procesos de amplificación y detección se producen de forma simultánea mediante el uso de moléculas que emiten fluorescencia (fluorocromos).

Los fluorocromos se excitan a través de diferentes fuentes de energía como láseres, diodos de luz, o lámparas de luz, emitiendo fluorescencia. Esta atraviesa un filtro que deja pasar la longitud de onda adecuada y es detectada en un fotodetector. La fluorescencia se mide en cada ciclo de amplificación y es proporcional a la cantidad de DNA formado.

Cada ciclo de amplificación de la qPCR consta de tres etapas:

- **Desnaturalización:** se incrementa la temperatura 95°C durante 20-30 segundos, provocando la separación de la doble cadena de DNA. En el caso de que la proporción de

G-C sea muy alta el tiempo puede ser mayor, ya que poseen 3 enlaces (uno más que A-T) (Costa, 2004) y si las cadenas no llegan a separarse se reduce el rendimiento de la reacción. En contraposición si el tiempo a esta temperatura es excesivo, se puede perder la actividad enzimática de la Taq Polimerasa (Castillo, 2014).

- **Hibridación:** Los cebadores se alinean en el extremo 3' de la cadena previamente separada e hibridan con su secuencia complementaria. Esto ocurre a 50-60°C durante 20 a 30 segundos. Esta temperatura es conocida como la temperatura de melting (T_m) y puede cambiar en función de las características de los cebadores utilizados. La T_m es definida como la temperatura a la cuál 50% de los cebadores se encuentra unido y la otra mitad se encuentra desnaturado. Normalmente la temperatura de hibridación es 5°C inferior a la T_m de los cebadores (Costa, 2004).
- **Elongación:** En esta etapa la Taq polimerasa actúa iniciando la síntesis de la cadena complementaria, utilizando al primer como referencia, a una temperatura de 72°C (Costa, 2004).

Mediante el empleo de un software, los resultados son representados a través una curva de amplificación. En ellos se muestra la fluorescencia en el eje de ordenadas, y el número de ciclos de la PCR en el eje de abscisas. Esta curva consta de tres fases, la primera de ella es la fase inicial, en esta la fluorescencia está por debajo del nivel de detección del termociclador, en la segunda fase se da un incremento de la fluorescencia exponencial y la tercera es donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

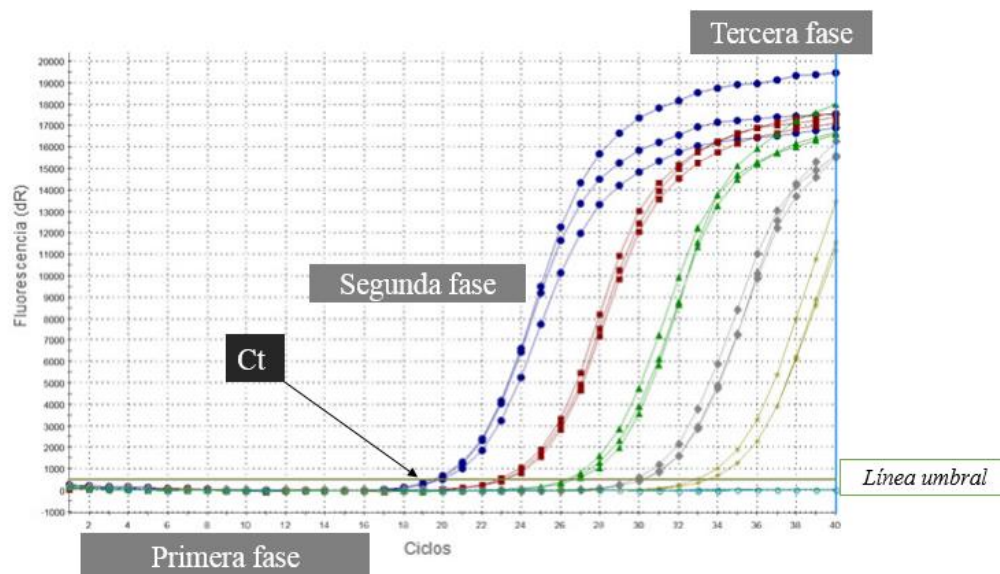


Figura 2. Curva de amplificación qPCR fases. Fuente (elaboración propia)

El punto de intersección entre la curva de amplificación y el umbral se conoce como Ct, e indica el ciclo en el que la fluorescencia emitida llega al valor umbral, y con él se puede observar la sensibilidad que tiene la técnica. La curva de disociación, que también viene dada a través de este análisis nos indica la especificidad. En el análisis con qPCR se utiliza el valor de Ct para determinar el número de copias inicial de DNA, se da en la fase exponencial y es un buen indicador ya que ningún componente está limitado en esta fase de la reacción (Cadenas, 2013).

Existen distintas técnicas de análisis a través de la PCR cuantitativa, las cuales se pueden dividir en: sistemas no específicos y sistemas específicos. Dentro de los más conocidos se encuentra SYBER Green, esta molécula está cargada positivamente y cuando se encuentra en solución no emite fluorescencia, pero al unirse a la doble cadena aumenta su fluorescencia 1,000 veces. Para asegurar la especificidad del producto amplificado se realizan curvas de disociación o curvas de melting, detectando de esta forma si se han formado dímeros durante la amplificación.

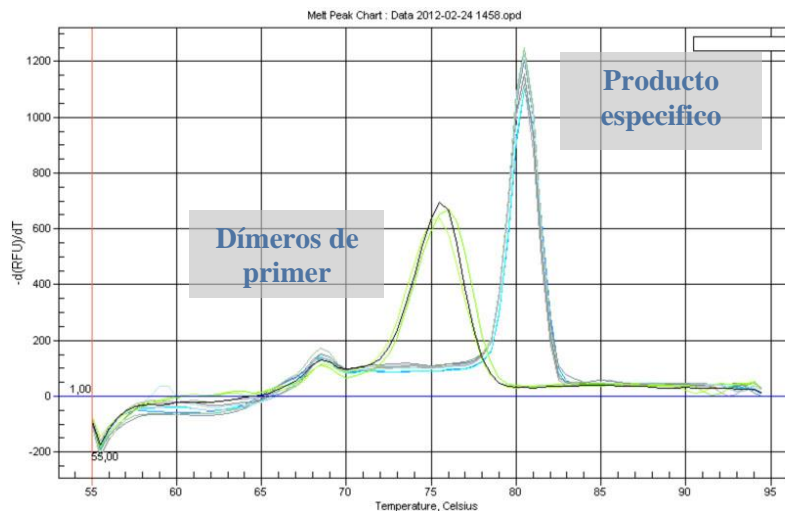


Figura 3. Curva de disociación qPCR amplificación dímeros. Fuente: Elaboración propia.

Los métodos específicos utilizan sondas que hibridan específicamente en la secuencia del DNA diana (Cadenas, 2013). Están integradas por dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre ambas moléculas. Las más empleadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las “molecular beacons” y las sondas FRET (Sergio et al., 2006).

Las sondas TaqMan son muy utilizadas, están compuestas por una serie de oligonucleótidos que se unen a la secuencia de interés. Están marcados en su extremo 5' con un fluorocromo de alta energía o donador (“reporter”) y su otro extremo 3' con un fluorocromo de baja energía o aceptor (“quencher”). Al estar próximas entre sí el fluorocromo con mayor energía actúa como donador de fluorescencia mientras que el de baja es el aceptor (absorbe esa energía). Durante la amplificación la Taq DNA polimerasa sintetiza la cadena simple de DNA y al llegar a la sonda la hidroliza (desensambla) sustituyendo los nucleótidos de la sonda y liberando los fluorocromos. Al separarse el fluorocromo de menor energía ya no absorbe la energía emitida por el donador de energía, lo que provoca un incremento de fluorescencia. Durante cada uno de los la fluorescencia aumenta su intensidad proporcionalmente, lo que es detectado y monitorizado. Esta fluorescencia es específica de la amplificación del gen que se quiere cuantificar (Cadenas, 2013).

En la siguiente figura se puede observar el mecanismo de acción de las sondas TaqMan o de hidrólisis.

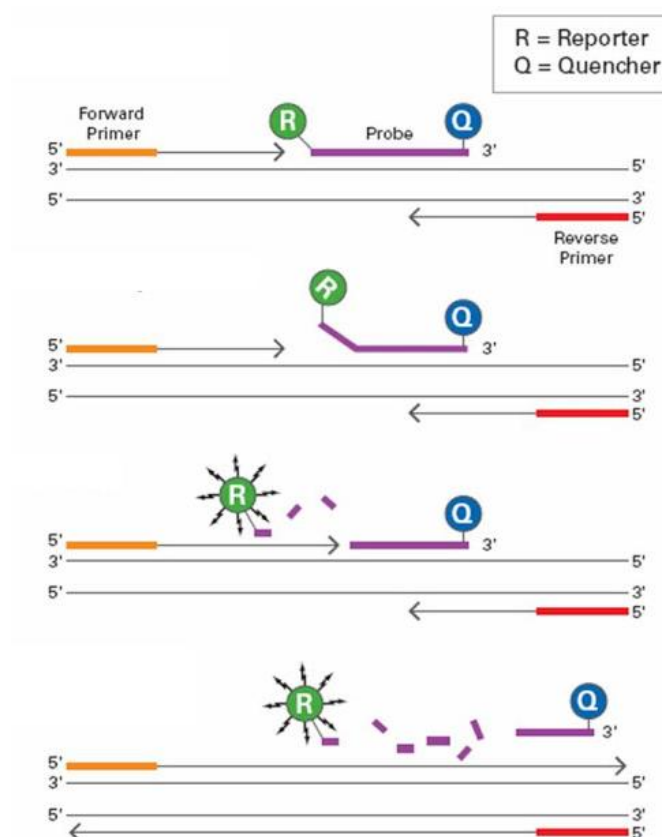


Figura 4. Mecanismo de acción sondas TaqMan. (Fuente: http://technologyinscience.blogspot.com.es/2013/05/#.WTqMv_nyjcs)

La identificación de *E. coli* mediante el uso de la qPCR

Una de las aplicaciones de la qPCR es la identificación de *E. coli* patógenas de transmisión alimentaria, se utiliza sobre todo en la detección de las cepas patógenas, diseñando cebadores que codifican genes de virulencia específicos, de producción de toxinas, plásmidos de resistencia antimicrobiana o plásmidos virulentos (Romeu, 2012). En la siguiente tabla se recogen algunos genes de virulencia utilizados en el análisis mediante qPCR:

Tabla 2. Categorías de *E. coli* diarrogénicas.

	Genes de virulencia y diagnóstico
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	st, lt
<i>E. coli</i> enteropatógena	eaeA
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	ipaH
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	eaeA, stx1, sxt2
<i>E. coli</i> enteroagregativa	aggR
<i>E. coli</i> de adherencia difusa	daaD

Fuente: (Lluque et al., 2010)

Además de los genes específicos para la detección de las cepas patógenas, se utilizan genes presentes en la mayoría de las cepas dentro de un mismo género para el recuento de los microorganismos marcadores. Unos de los genes más empleados para el recuento de *E. coli* es el gen uidA. El gen uidA, también conocido por gusA, es uno de los genes que se emplea rutinariamente para identificar específicamente la *E. coli*. Este gen tiene un tamaño de 566 pares de bases, codifica para la enzima β -D-glucuronidasa (188 aa) (NCBI, 2017.), y se encuentra en más del 97% de las cepas de *E. coli*, incluida la variante patógena O157:H7 VTEC. La cepa patógena O157:H7 no expresa la proteína y por tanto no tiene actividad β -D-glucuronidasa, aunque sí contiene este gen, incluyendo las regiones reguladoras (Wang, Gill, & Yang, 2014).

El análisis del gen uidA, responsable de la actividad GUD, ha evidenciado la existencia de varios cambios conservados asociados únicamente con la cepa *E. coli* O157:H7, siendo uno de ellos es una mutación en la posición +93 (T→G). Este cambio no es responsable de la pérdida de la actividad GUD de la cepa y es altamente conservado. Por ello, es empleado en la identificación de las cepas O157:H7 por métodos moleculares.

El desarrollo de métodos moleculares basados en la detección del gen uidA para la cuantificación de *E. coli* en leche cruda como indicador de calidad higiénica, permitirá ofrecer a la industria láctea una herramienta eficaz y rápida y dentro de su sistema Análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC).

3 OBJETIVO

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es desarrollar un método de detección rápido basado en la PCR a tiempo real o qPCR para el recuento de *Escherichia coli* en leche cruda. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de las condiciones de amplificación del gen uidA mediante qPCR.
- Optimización de la técnica qPCR para el recuento de *E. coli* en cultivo puro.
- Evaluación de la técnica qPCR optimizada en muestras de leche inoculadas experimentalmente con niveles conocidos de *E. coli*.
- Validación de la metodología en base a la sensibilidad, reproducibilidad y repetitividad.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado la cepa 516 de *E. coli* de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En primer lugar, se hizo crecer las bacterias para disponer de un cultivo puro del que poder obtener el DNA. Una vez medida la concentración y calidad del mismo, el DNA fue utilizado para la puesta a punto de la técnica para el recuento de *E.coli*.

4.1 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE *E. COLI*.

Se partió de una colonia aislada en agar BHIA (Brain Heart Infusion Broth agar, Pronadisa) utilizando la técnica de siembra de agotamiento por estrías y se inoculó en 3 ml de caldo BHI (Brain Beart Infusion Broth). A continuación, se realizó la incubación durante aproximadamente 17 horas, con una agitación de 80 rpm (Yang, Badoni, & Gill, 2011). Como control negativo se incubó un tubo con 3 ml de BHI y sin inocular.

4.2 EXTRACCIÓN DEL DNA

La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando el kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo del fabricante que se describe a continuación: en un tubo eppendorf de 1,5 mL se vertió 1 mL de la suspensión bacteriana y se centrifugó durante 5 min a 8.000 g. A continuación, se separó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet precipitado en 180 μ L de Buffer T1. Se adicionaron 25 μ L de Proteinasa K, se agitó con un agitador tipo vortex y se incubó la mezcla a 56 °C durante 1 hora.

Pasado el tiempo de incubación y tras agitar la muestra, se añadieron 200 μ L de Buffer B3, se volvió a agitar y se incubó la muestra a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se incorporaron 210 μ L de etanol (96 - 100%) y se agitó vigorosamente.

Cada una de las muestras se transfirió a una columna del kit NucleoSpin Tissue de membrana de sílica que se encontraba contenida en un tubo eppendorf, y se centrifugó durante 1 min a 11.000 g. Se desechó el filtrado y procedió a lavar la membrana; un primer lavado con 500 μ L de Buffer BW y un segundo lavado con 600 μ L de Buffer B5, centrifugando durante 1 min a 11.000 g en ambos casos. Seguidamente, se secó la membrana de sílica centrifugando durante 1 min a 11.000 g.

Por último, mediante una centrifugación durante 1 min a 11.000 g, se eluyó el DNA en dos volúmenes de Buffer BE, 100 μ L y 50 μ L, para poder determinar cuál era la opción que permitía una mejor recuperación del DNA de la muestra.

4.3 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Para la determinación de la concentración y cantidad del DNA de las muestras, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que cuantifica el DNA (ng/ μ L) a través de la medición de la absorbancia a 260 nm. Así mismo, mediante la relación de absorbancias ($A_{260/280}$) se evaluó la pureza de las muestras. Una relación de $A_{260/280}$ de 1,8 - 2 se considera de pureza óptima, de 1,6 - 1,8 aceptable y valores inferiores indican la presencia de otros compuestos o contaminación (Banco nacional de ADN, 2017).

Para llevar a cabo la cuantificación del DNA con el Nanodrop se utilizó 1 µl de muestra, con el equipo previamente calibrado con el blanco correspondiente.

4.4 AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Para la realización del recuento de *E.coli* en leche cruda se seleccionó el gen *uidA*, implicado en la síntesis de la enzima β-glucuronidasa presente en más del 97% de las cepas de *E.coli*. Una de las etapas necesarias para la amplificación de este gen es el diseño de los cebadores y sonda de fluorescencia.

4.4.1 Diseño de cebadores y sonda de fluorescencia.

Los cebadores y las sondas fueron diseñados en base a una región conservada del gen *uidA* de *E. coli*, utilizando el trabajo de Wang et al. (2014) como referencia. Una vez seleccionada la diana específica del microorganismo, se comprobó la especificidad teórica de las secuencias seleccionadas mediante comparación con las secuencias existentes en las bases de datos de nucleótidos, utilizando la búsqueda avanzada del BLAST (disponible en la página web del NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Por último, cebadores y sondas fueron diseñados utilizando el programa Primer Express de Applied Biosystems. De todas las posibles combinaciones de cebadores y sondas de detección TaqMan se seleccionó la combinación óptima que cumpliera los parámetros establecidos para las reacciones de PCR a tiempo real.

En el diseño de los cebadores y sonda para garantizar un alto grado de especificidad y eficiencia de los cebadores se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- El tamaño de amplicon debe ser de 50 -100 pb para ensayos en los que se utilice sondas de hibridación, o inferior a 300 en los que se use SYBR Green (los amplicones más cortos se amplifican más eficientemente y son más tolerantes a las condiciones de reacción).
- La longitud óptima para los cebadores debe ser de 15 - 20 pares de bases con un contenido de G / C del 20 - 80%.
- La Temperatura de melting (T_m) debe estar en un intervalo de 68 - 70°C en el caso de los cebadores. Si se utiliza sonda esta no debe tener un T_m que se encuentre 10°C por encima de la T_m de los mismos.
- Las amplificaciones inespecíficas se minimizan seleccionando cebadores que tienen sólo uno o dos G / Cs dentro de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3'(Arya et al., 2000).

En la siguiente tabla se muestran las características de los cebadores utilizados:

Tabla 3. Características de los cebadores y sonda diseñados.

Nombre del gen	Secuencia (5'-3')	Producto amplificado (pb)
<i>uidA</i>	Forward - ACGCATGTCGCGCAAGA	88
	Reverse - CCGCATCACGCAGTTCAAC	
Sonda <i>uidA</i>	6-FAM- CTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCC-TAMRA	

4.5 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA qPCR.

La amplificación del DNA de *E.coli* se realizó mediante dos sistemas. Por un lado, se utilizó el método de SYBR Green para comprobar la correcta amplificación del gen de interés y optimar la concentración de cebadores que ofrecía mejores resultados. Una de las ventajas del uso de este fluorocromo es que es más económico, en cambio, ofrece menor especificidad durante la reacción. Es por ello que para asegurar que el producto amplificado es el correcto se realizan las curvas de disociación y su visualización en un gel de agarosa.

Una vez estandarizadas las concentraciones de cebadores y la especificidad de los mismos, se utilizó un sistema basado en las sondas TaqMan el cual ofrece mayor especificidad. Para el que también se ensayó su concentración óptima.

4.5.1 Concentración de cebadores y comprobación de la especificidad con SYBR Green

Una vez realizado el cultivo de una colonia de *E. coli* CECT 516 y posterior extracción y cuantificación de DNA, se diseñó una matriz de cebadores para la determinación de la concentración más adecuada para llevar a cabo una correcta amplificación del fragmento de interés, utilizando para ello tres concentraciones de DNA (Tabla 4).

Tabla 4. Matriz de cebadores para el gen *uidA* ensayada con diferentes concentraciones de DNA.

Cebadores	DNA	Cebadores	DNA	Cebadores	DNA
0,1 μ M	5 ng	0,3 μ M	5 ng	0,6 μ M	5 ng
0,1 μ M	50 ng	0,3 μ L	50 ng	0,6 μ M	50 ng
0,1 μ M	100 ng	0,3 μ M	100 ng	0,6 μ M	100 ng

Para realizar la qPCR las reacciones de amplificación se prepararon teniendo en cuenta los volúmenes indicados en la Tabla 5.

Tabla 5. Volumen de los reactivos (μ L) utilizados en la qPCR para la optimización de la concentración de los cebadores.

Reactivos	DNA 5 ng			DNA 50 ng			DNA 100 ng		
SYBR Premix (2X)	5			5			5		
Primer forward (10 μ M)	0,1	0,3	0,6	0,1	0,3	0,6	0,1	0,3	0,6
Primer reverse (10 μ M)	0,1	0,3	0,6	0,1	0,3	0,6	0,1	0,3	0,6
cDNA	1,02			1,02			2,04		
Agua miliQ*	-			-			-		
Volumen total	10			10			10		

*El volumen de agua miliQ se obtiene de la diferencia del volumen total y los reactivos en cada caso.

La reacción de amplificación fue realizada en placas de 96 pocillos (Multiplate™ 96-Well PCR Plates, Biorad) y esta se llevó a cabo en el termociclador FX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). El programa seleccionado para la amplificación del DNA para este análisis atendía a los siguientes ciclos y temperaturas:

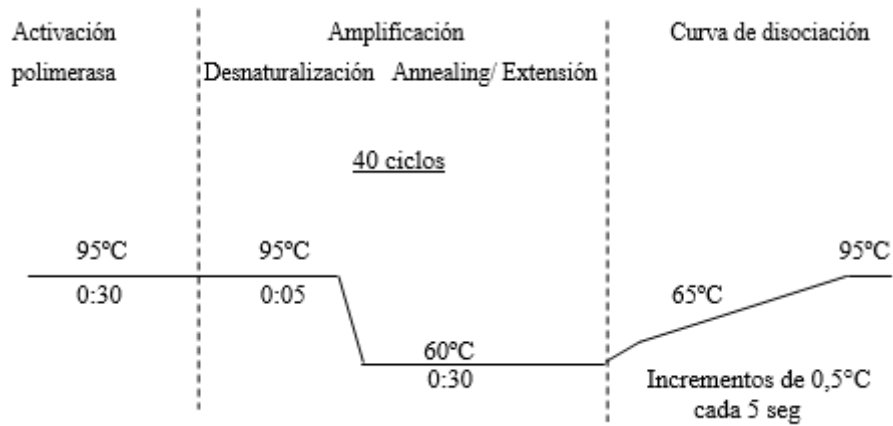


Figura 5. Programa de amplificación utilizando como fluorocromo el SYBR Green. Fuente: Elaboración propia.

Una vez terminada la amplificación, mediante el análisis de las curvas de disociación (curva de melting) se aseguró la presencia de un único producto de amplificación y la ausencia de productos inespecíficos como los dímeros de cebadores.

Por otro lado, se realizó una electroforesis de DNA en gel de agarosa al 2%. Para ello, se pesaron 1 g de agarosa (Sigma) en un erlenmeyer y se añadieron 50 mL de la solución tampón TBE 0,5 X (Tris, ácido bórico y EDTA). Para favorecer la disolución de la mezcla, esta se llevó a ebullición y se añadieron 2,5 μ L del agente de tinción (SYBR Safe, Invitrogen). A continuación, se vertió el preparado en un molde para electroforesis con el peine previamente colocado. Una vez solidificado (30 minutos aproximadamente), se sumergió el gel en una cubeta de electroforesis con buffer TBE 0,5X. Seguidamente, las muestras con 12 μ L del producto de qPCR y 4 μ L de tampón de carga (1,5 g de Ficoll 400 y 0,025 g de Xylene cyanol FF) se cargaron en los pocillos del gel, así como un pocillo con 4 μ L del marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 minutos. El protocolo que se ha descrito para la elaboración del gel queda resumido en la siguiente figura:

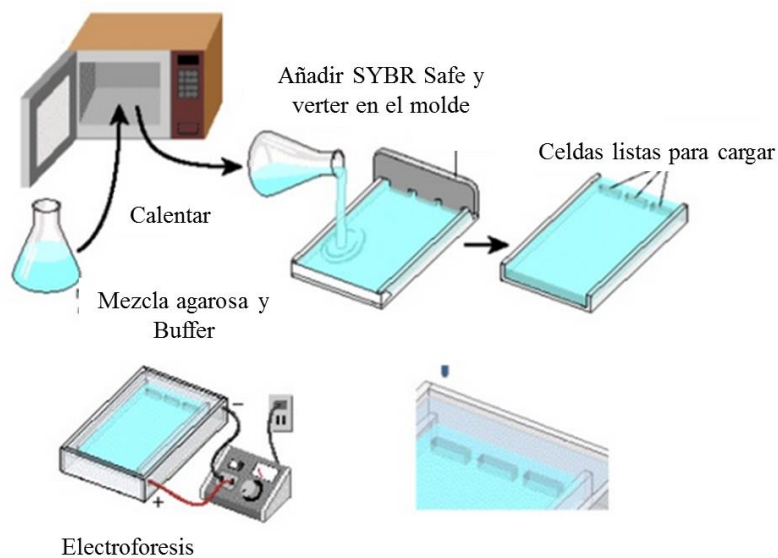


Figura 6. Elaboración del gel de agarosa para la electroforesis de DNA. Fuente: http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab6/prepare.html

4.5.2 Concentración de la sonda.

Una vez establecida la concentración de los cebadores se ensayó cual era la concentración de sonda óptima. Para ello, se diseñó una matriz con tres concentraciones de sonda y DNA, como queda representado en la siguiente tabla:

Tabla 6. Matriz de concentración de sonda para el gen *uidA* ensayada con diferentes concentraciones de DNA.

Sonda	DNA	Sonda	DNA	Sonda	DNA
0,1 μ M	5 ng	0,2 μ M	5 ng	0,4 μ M	5 ng
0,1 μ M	50 ng	0,2 μ M	50 ng	0,4 μ M	50 ng
0,1 μ M	100 ng	0,2 μ M	100 ng	0,4 μ M	100 ng

Las reacciones de amplificación para la PCR a tiempo real se prepararon teniendo en cuenta los volúmenes indicados en la siguiente tabla:

Tabla 7. Volumen de los reactivos (μ L) utilizados en la qPCR para la optimización de la concentración de los cebadores.

Reactivos	DNA 5 ng			DNA 50 ng			DNA 100 ng		
<i>Premix ex Taq (Probe qPCR) (2x)</i>	5			5			5		
<i>Primer forward (10 μM)</i>	0,3			0,3			0,3		
<i>Primer reverse (10 μM)</i>	0,3			0,3			0,3		
<i>Sonda (10 μM)</i>	0,1	0,2	0,4	0,1	0,2	0,4	0,1	0,2	0,4
<i>cDNA</i>	1,02			1,02			2,04		
<i>Agua miliQ*</i>	-			-			-		
<i>Volumen total</i>	10			10			10		

*El volumen de agua miliQ se obtiene de la diferencia del volumen total y los reactivos en cada caso.

Al igual que en el apartado anterior, la reacción de amplificación se realizó en placas de 96 pocillos (Multiplate™ 96-Well PCR Plates, Biorad) en el termociclador FX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). En la Figura 7 se muestra el programa empleado para la amplificación del DNA en el que no se incluye la curva de disociación, ya que no es necesario al utilizar las sondas específicas.

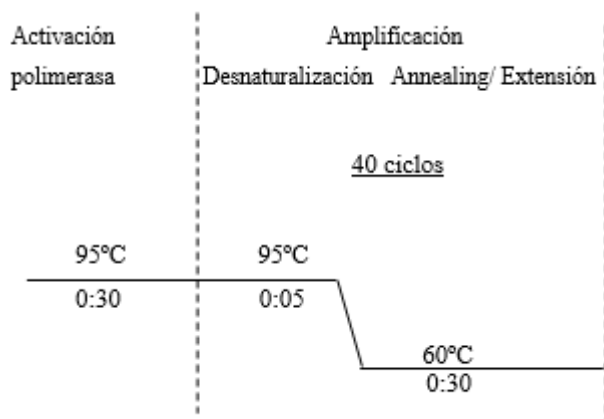


Figura 7. Programa de amplificación utilizando como fluorocromo la sonda TaqMan. Fuente: Elaboración propia.

4.6 RANGO DINÁMICO DE CONCENTRACIÓN DE DNA.

En la validación de cualquier protocolo de PCR que tenga como objetivo la cuantificación de DNA se debe establecer primero un rango de concentraciones entre las cuales el método funciona correctamente. Este rango nos indica la concentración más alta y más baja en donde los resultados obtenidos son fiables. Esto se llevó a cabo mediante la elaboración de una curva estándar a partir de concentraciones conocidas del DNA mediante el uso tanto del SYBR Green como de la sonda TaqMan. Se emplearon ambos fluorocromos con objeto de saber la especificidad y sensibilidad ofrecida por cada una de ellas.

Para la realizar las curvas estándar, se partió de una muestra de DNA de *E. coli* con una concentración de 48,9 ng/ μ L y una ratio A_{260}/A_{280} de 1,85. Se prepararon las diluciones seriadas 1:10 desde 10^0 hasta 10^{-8} con agua miliQ en tubos eppendorf, agitando entre cada una de las diluciones.

Las diluciones obtenidas se amplificaron a través de la PCR a tiempo real. En el caso del SYBR Green los reactivos para la reacción de amplificación fueron los siguientes: 1,5 μ L de cDNA, 5 μ L de SYBR Premix Ex Taq (2x), 0,3 μ L (10 μ M) de cada cebador Forward y Reverse y agua miliQ hasta completar el volumen final. El programa de amplificación empleado fue el descrito en el apartado 4.5.1.

Para la sonda TaqMan la mezcla de la reacción contenía 1,5 μ L de cDNA, 5 μ L de 2X Premix Ex Taq (Probe qPCR), 0,3 μ L (10 μ M) de cada primer Forward y Reverse, 0,2 μ L de sonda (10 μ M) y agua miliQ hasta completar el volumen final. El protocolo de amplificación utilizado en este caso fue el definido en el apartado 4.5.2.

Los resultados obtenidos se representaron gráficamente, los Ct en el eje de ordenadas y la concentración de DNA de las diluciones con escala logarítmica en el eje de abscisas, de manera que se obtiene una recta. Para estimar la eficiencia se utilizó el valor de la pendiente de la recta de la misma. Si la pendiente de la recta presenta un valor en torno a -3,34 y el índice de determinación, R^2 , se encuentra entre los valores de 0,97 y 1, indica que las curvas estándar presentan unas buenas características (Nolan, Tomley, Kaiser, & Blake, 2015). El valor resultante de la pendiente de la curva (s) se utiliza para calcular la eficiencia de la amplificación de los cebadores, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia} = \left[\left(10^{-1/s} \right) - 1 \right] \times 100$$

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo de la eficiencia en la PCR a tiempo real.

4.7 CURVA DE CALIBRACIÓN CELULAR

Una vez establecido el rango dinámico de concentración del método, se realizó un ensayo para determinar la sensibilidad del método mediante la elaboración de una curva de calibración celular. Con ella se establece la mínima cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (u.f.c/mL) detectable por la técnica de qPCR.

Para la elaboración de la curva de calibración celular se empleó el sistema de detección específico basado en la sonda TaqMan.

El protocolo que se siguió para realizar la curva de calibración celular se resume en la *Figura 8*. Se preparó la suspensión inicial de *E. coli* según el protocolo descrito anteriormente y se realizaron diluciones seriadas de 10^0 a 10^{-8} , agitando 30 segundos entre dilución y dilución. De cada una de las diluciones se pipeteo con una micropipeta 1 mL y se vertió sobre un eppendorf, rotulándolo con su correspondiente muestra. A continuación, se extrajo el DNA mediante el Kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) a través del protocolo anteriormente descrito.

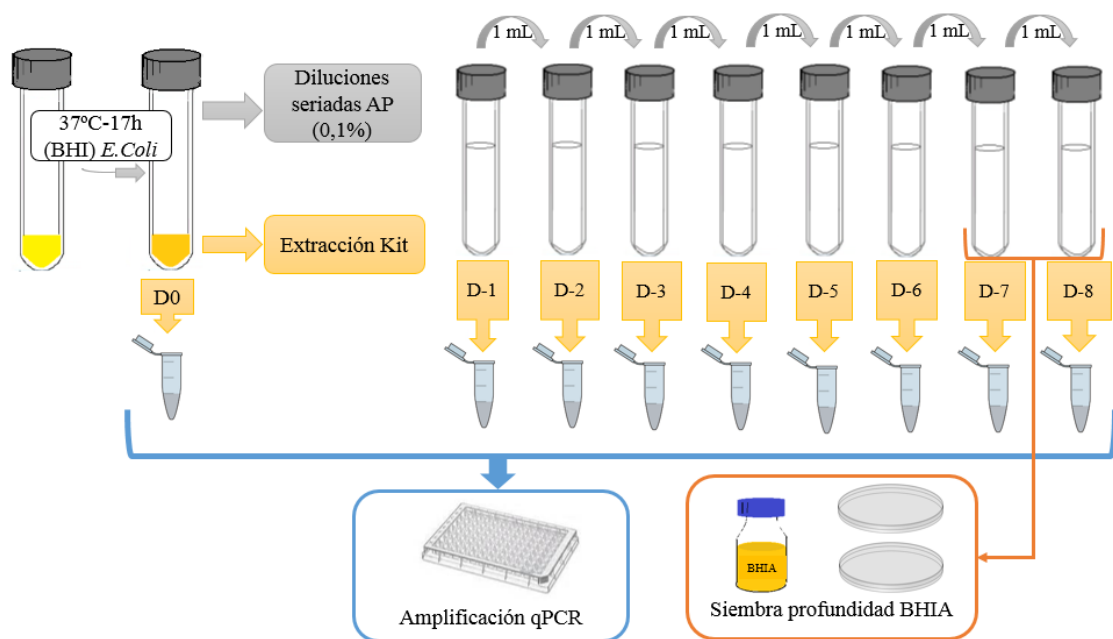


Figura 8. Ensayo curva de calibración celular. Fuente: Elaboración propia.

Paralelamente se preparó el medio BHIA y se atemperó hasta llegar a 40°C, una vez alcanzada esa temperatura se sembraron en profundidad las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} por duplicado, con un control negativo. Para la siembra en profundidad se pipeteo 1 mL de cada muestra en una placa de Petri vacía y rotulada en la base. Posteriormente se añadieron 20 mL del medio de cultivo y se homogenizaron con 15 movimientos ascendentes - descendentes y 15 laterales. Se dejó solidificar y se llevó a incubar en una estufa a 37°C durante 24 horas, colocándolas boca abajo.

Para el cálculo del número de colonias crecidas, se utilizó un contador de colonias manual y se extrapoló al número de unidades formadoras de colonias/mL a través de la siguiente fórmula:

$$u. f. c./mL = \frac{\text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrado (mL)}}$$

Ecuación 2. Fórmula para el recuento de unidades formadoras de colonias por mL.

Una vez se extrajeron cada una de las diluciones, éstas se amplificaron por PCR a tiempo real siguiendo el protocolo descrito para las sondas TaqMan en el apartado 5.2.1.

Finalmente, con los valores de Ct obtenidos para cada concentración de bacterias se representa la curva de calibración celular, cuya pendiente se empleó para calcular la eficiencia de amplificación.

4.8 CURVA DE CALIBRACIÓN EN LECHE

Tras realizar la curva de calibración celular, se determinó la curva en leche, implementando de esta forma el uso de la técnica en leche cruda y validando el método en esta matriz. Para ello se realizó se contaminó artificialmente de la leche cruda, atendiendo al siguiente protocolo:

Se preparó la suspensión inicial de *E. coli*, según el protocolo descrito anteriormente, para obtener un cultivo del que poder contaminar la leche. Posteriormente, se prepararon las diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% hasta llegar a 10^{-7} , agitando 30 segundos después de la inoculación de cada uno de los tubos. Estas diluciones fueron las que se utilizaron para contaminar las muestras.

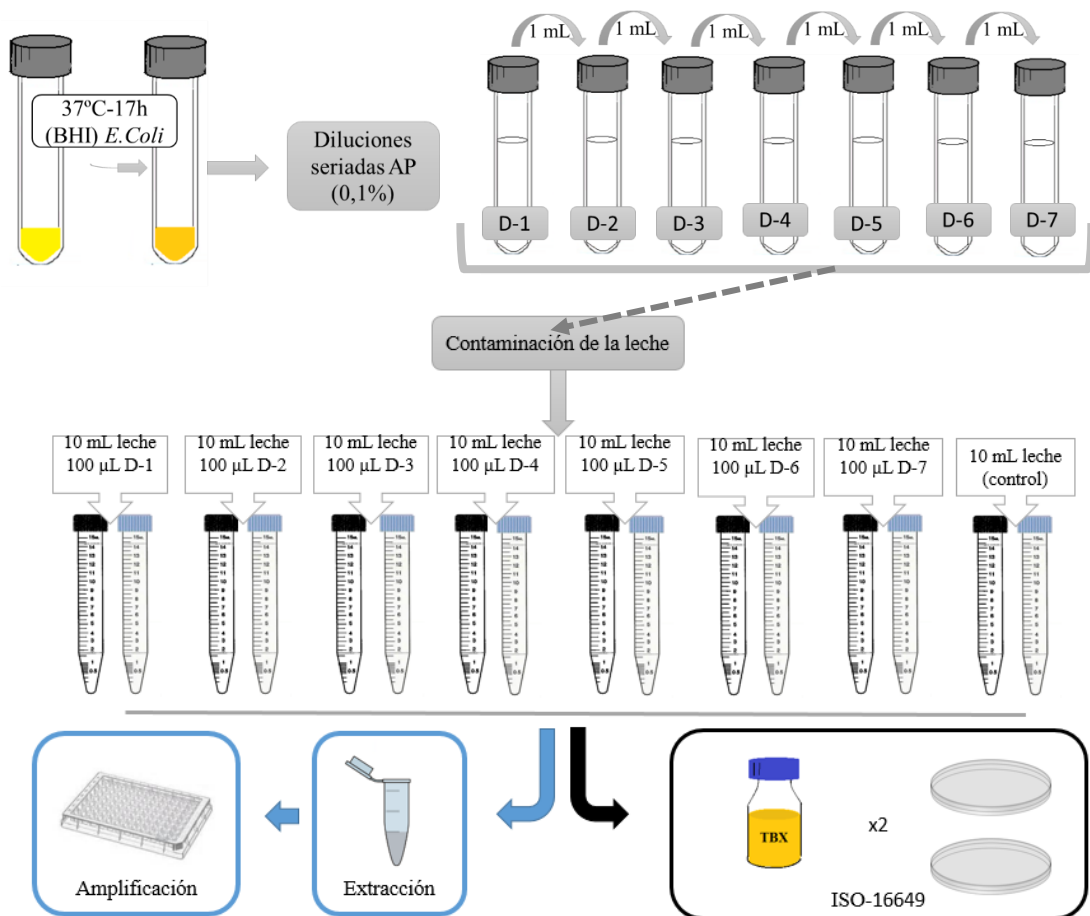


Figura 9. Ensayo curva de calibración celular en leche. Fuente: Elaboración propia.

Paralelamente, se pipetearon 10 mL de leche fresca con una pipeta serológica estéril de 10 mL en 8 tubos Falcon de plástico de 15 mL, por duplicado. El duplicado se hizo para la extracción del DNA y la siembra en profundidad mediante la norma ISO – 16649.

Para la contaminación artificial de la leche, a los 10 mL de leche de cada duplicado se añadieron 100 µl de la disolución 10^{-1} . Se pipetearon 100 µL de la dilución 10^{-2} a los 10 mL de leche para la obtención de la muestra 2 (M2), y así sucesivamente hasta la muestra 7 (M7). Para el control negativo se utilizó un tubo con 10 mL de leche (M8).

Las muestras destinadas a la extracción del DNA de *E. coli* se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 g. Con ayuda de una micropipeta, se quitó el sobrenadante de cada uno de los tubos y se pipetearon 1 mL de PBS (10 X, pH 7,4) homogenizando con la pipeta el precipitado formado para su adecuada disolución. A continuación, el contenido de cada uno de los tubos se transfirió a tubos eppendorf de 1,5 mL, para proceder a su extracción según el protocolo descrito en el apartado 4.2.

Por otro lado, el cultivo en placa se realizó según la norma ISO-16649 (parte 2) donde se realiza una siembra en profundidad. Para ello, las muestras se homogenizaron durante 30 segundos y las muestras M1, M2, M3 y M4 se diluyeron antes de ser inoculadas.

Para la preparación de la M1 se llevaron a cabo 4 diluciones (1:10), se pipeteo 1 mL de la disolución M1 a 9 mL de agua de peptona al 0,1% (10^{-1}). A continuación, se agitó durante 30 segundos y se pipeteo 1 mL a 9 mL de agua de peptona (10^{-2}), y así sucesivamente hasta llegar a 10^{-4} . La muestra M2 se diluyo tres veces (10^{-3}), la M3 dos veces (10^{-2}) y la M4 una vez (10^{-1}), según el protocolo anteriormente descrito.

En una placa de Petri vacía se pipeteó 1 mL de cada una de las muestras por duplicado, y se incorporó el medio de cultivo TBX previamente atemperado a 40 - 45°C (20 mL aproximadamente). También se preparó un control negativo. Se homogenizaron las placas con movimientos de vaivén laterales y ascendentes y, una vez solidificado el agar, se incubaron invertidas a 44°C durante 24 h.

A continuación, se realizó la amplificación del DNA utilizando la sonda TaqMan de las muestras M1-M8, siguiendo las condiciones de amplificación descritos en el apartado 4.6

4.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una validación consiste en un procedimiento para evaluar las características de un proceso de medida y verificar que esas características cumplen una serie de requisitos preestablecidos.

Para un correcto proceso de validación, hay una serie de parámetros que es necesario calcular con los resultados obtenidos:

Para la validación de los resultados obtenidos por la técnica descrita en este trabajo se han considerado los siguientes parámetros:

- **Sensibilidad o límite de detección:** se define como la cantidad mínima de DNA que es capaz de producir amplificación, pero no cuantificarse con un valor exacto (Cadenas, 2013).
- **Límite de cuantificación:** magnitud mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud.

- **Reproducibilidad:** se aplica a aquellas medidas que se realizan en diferentes condiciones, ya sean distintos trabajadores, equipos, laboratorios, muestra base o con grandes diferencias de tiempo (Griful & Canela, 2005).
- **Repetibilidad:** hace referencia a las medidas que se hacen bajo las mismas condiciones (lo más estable posible), por el mismo trabajador y mismo equipo. Y se mide mediante el grado de concordancia entre las réplicas durante la realización de un ensayo.

Para medir la reproducibilidad, en primer lugar, se hicieron dos réplicas de la técnica de contaminación de la leche, extracción y PCR a tiempo real (replica de todo el proceso). Por otro lado, se hicieron tres réplicas de la amplificación por qPCR de las muestras procedentes de una extracción en tres días diferentes. Estos análisis se hicieron en las curvas en calibración en leche.

La repetibilidad se evaluó (en las curva de calibración en leche), en cada qPCR realizando triplicados en cada una de las diluciones. Teniendo en cuenta que se realizaron tres qPCR en tres días diferentes la repetibilidad se testó veces.

La reproducibilidad y repetibilidad se calcula mediante el coeficiente de varianza, que nos indica el grado de dispersión de los datos obtenidos entre las diferentes repeticiones.

5 . RESULTADOS

5.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

5.1.1 Concentración de cebadores y DNA con SYBR Green

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan reflejados en la *Tabla 8*:

Tabla 8. Valores medios de Ct, ± SD obtenidos a partir del DNA de E. coli.

		Concentración cebadores (μM)	Media Ct	SD*
Concentración DNA	5 ng/ μL	0,1	16,717	0,209
		0,3	16,027	0,094
		0,6	15,843	0,199
Concentración DNA	50 ng/ μL	0,1	12,919	0,116
		0,3	12,167	0,065
		0,6	12,107	0,067
Concentración DNA	100 ng/ μL	0,1	12,525	0,084
		0,3	11,658	0,121
		0,6	11,465	0,342

*SD = desviación estándar.

Los valores de Ct obtenidos en la qPCR son muy similares en las tres concentraciones de cebadores estudiadas para cada una de las concentraciones de DNA. Al aumentar la concentración de DNA los valores de Ct son menores, ya que son necesarios menos ciclos para llegar al valor umbral. La concentración de los cebadores seleccionada fue de 0,3 μM debido a que la desviación estándar de los valores de Ct fueron menores en este caso.

En relación a la especificidad de los cebadores usando el SYBR Green, en la *Figura 10* se presentan las curvas de disociación producidas tras la amplificación de las muestras.

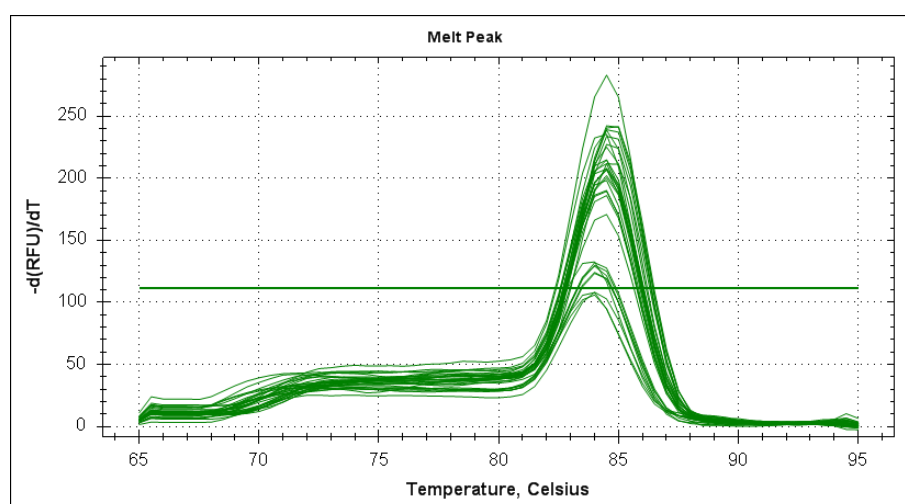


Figura 10. Curva de disociación durante la qPCR.

Como puede apreciarse solamente se observa un pico correspondiente a un único producto de amplificación, verificando que no se han producido productos inespecíficos como dímeros de cebadores.

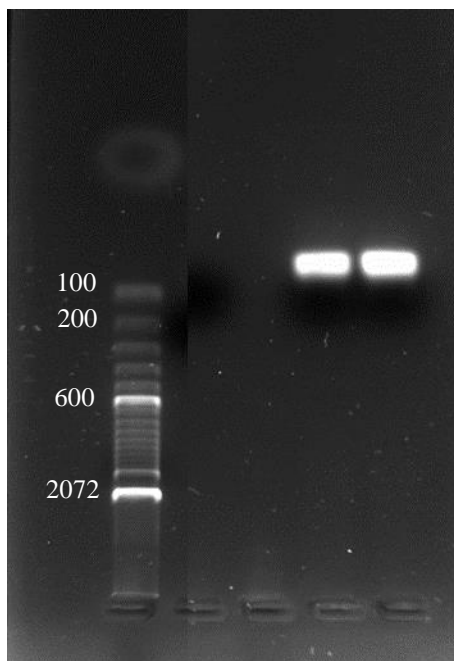


Figura 11. Electroforesis en gel agarosa del gen *uidA* de *E. coli*.

La Figura 11 corresponde a una electroforesis en gel agarosa del producto amplificado en la PCR cuantitativa. Como se observa el tamaño del fragmento es de aproximadamente 88 pb, por tanto, los cebadores amplificaron correctamente el gen diana utilizando el SYBR Green.

5.1.2 Concentración de cebadores y DNA con sonda Taqman

Los resultados obtenidos en la optimización de la concentración de sonda para la amplificación del gen *uidA* en *E. coli* se reflejan en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores medios de $Ct \pm SD$ obtenidos a partir del DNA de *E. coli*.

		Concentración sonda (μM)	Ct media	SD^*
Concentración DNA	5 ng/ μL	0,1	18,721	1,11
		0,2	17,108	0,222
		0,4	16,558	0,381
Concentración DNA	50 ng/ μL	0,1	14,713	0,12
		0,2	14,236	0,088
		0,4	13,719	0,231
Concentración DNA	100 ng/ μL	0,1	14,052	0,259
		0,2	13,321	0,091
		0,4	12,767	0,118

*SD = desviación estándar.

Mediante el uso de la concentración de 0,4 μM se obtuvieron los valores de Ct más bajos en las tres concentraciones de DNA ensayadas. Sin embargo, utilizando una concentración 0,2 μM las desviaciones estándar de los Ct fueron inferiores, y el valor de los Ct se consideraron aceptables, por lo que la concentración de sonda seleccionada fue esta última.

5.2 RANGO DINÁMICO DE CONCENTRACIÓN DE DNA

Los resultados referentes a las curvas estándar del gen *uidA* obtenidas con el SYBR Green y las sondas TaqMan y la eficiencia de la reacción de qPCR se presentan en la *Figura 12* y *Tabla 10*.

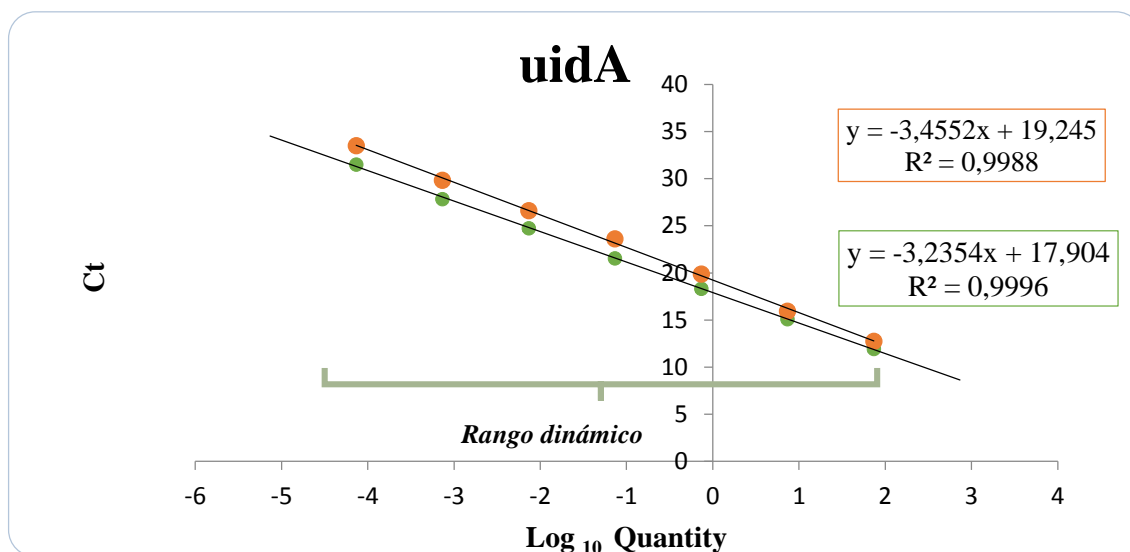


Figura 12. Curva estándar del Gen *uidA* mediante el uso de SYBR Green (verde) y sonda TaqMan (naranja).

Tabla 10. Eficiencias de amplificación en la PCR a tiempo real en el estudio del rango dinámico de concentración de DNA.

	Pendiente	Eficiencia	R^2
Gen <i>uidA</i> (SYBR Premix)	-3,24	103,742	1,00
Gen <i>uidA</i> (Sonda TaqMan)	-3,46	94,724	1,00

El rango dinámico de concentración de DNA obtenido fue de 7,35 ng- 0,073 pg.

Las curvas estándar obtenidas tras la amplificación del gen *uidA* de *E. coli* presentaron un índice de determinación, $R^2 > 0,99$ en ambos casos. Por otro lado, los valores de eficiencia obtenidos para el SYBR Green y la sonda TaqMan fueron de 103,74% y 94,72% respectivamente. Según lo indicado por Nolan et al. (2015), un valor de pendiente de -3,322 corresponde con una eficiencia de amplificación de 100%, siendo valores de 90 - 115% considerados como aceptables. Por tanto, las eficiencias de la amplificación obtenidas fueron adecuadas.

5.1 CURVA DE CALIBRACIÓN CELULAR

En la *Tabla 11* se observan los resultados obtenidos en el recuento de colonias de *E. coli*, llevados a cabo para realizar la curva de calibración celular.

Tabla 11. Recuento de colonias *Escherichia coli*.

Muestras	Recuento por duplicado		u.f.c/mL
Dilución 10^{-7}	757	765	$7,6 \times 10^9$
Dilución 10^{-8}	88	64	$7,6 \times 10^9$

Como se ve en la tabla, aplicando la fórmula para el cálculo de la concentración inicial del cultivo, se obtuvo un recuento de $7,6 \times 10^9$ u.f.c/mL.

Los resultados de la curva de calibración celular se representan en la Figura 13:

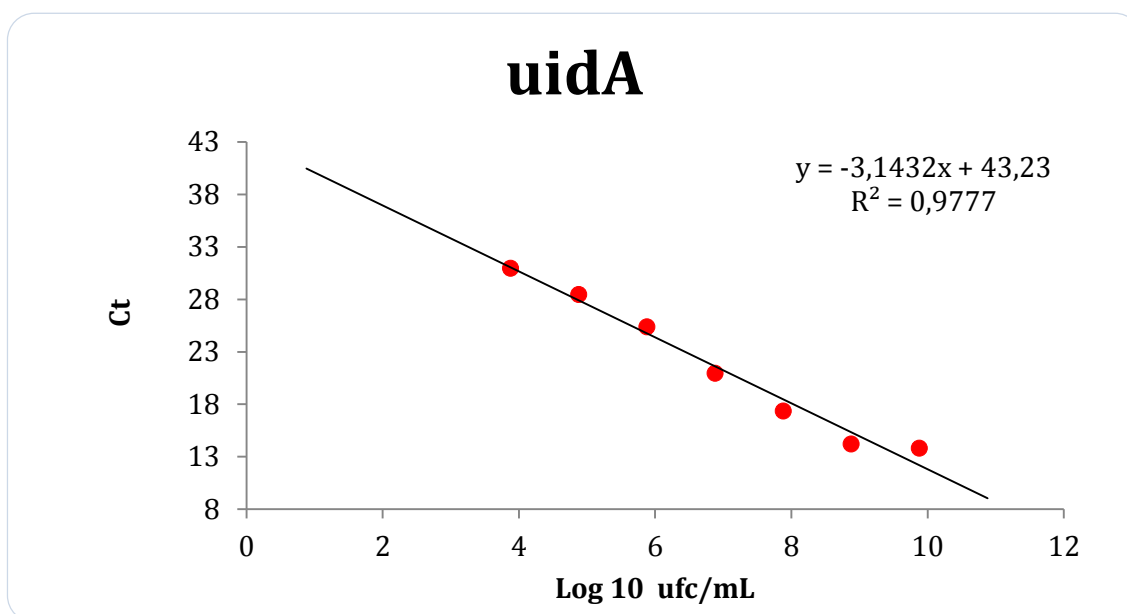


Figura 13. Curva de calibración celular obtenida a partir de la amplificación del gen *uidA* de *E. coli*.

Los resultados de la eficiencia de la reacción de qPCR obtenidos a partir curva se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Eficiencias de amplificación en la PCR a tiempo real.

	Pendiente	Eficiencia (%)	R^2
Gen <i>uidA</i>	-3,14	108,04	0,97

La linealidad obtenida fue de 0,97, valor muy cercano al valor de referencia 1,00. Por otro lado, la eficiencia de la reacción obtenida fue adecuada, con un valor del 108,04%, ya que se encuentra entre 90 y 115%.

Los resultados de la curva de calibración celular indican que el límite de cuantificación fue de $7,6 \times 10^3$ u.f.c/ ml. Esta es la concentración más baja que puede ser cuantificada con una precisión adecuada. Este punto se corresponde con 114 copias del genoma de *E. coli* en la reacción PCR, ya que se extrajo el DNA de $7,6 \times 10^9$ u.f.c de *E. coli*, este fue eluido en 100 μ L y se amplificó un volumen de 1,5 μ L.

No obstante, el límite de detección se estableció en $7,6 \cdot 10^1$ u.f.c/ ml, lo que equivale a un valor de Ct $31,07 \pm 0,08$ (ver resultados en Anejo 2).

5.2 CURVA DE CALIBRACIÓN EN LECHE

En la *Tabla 13* se muestran los resultados del recuento microbiológico de las colonias sembradas en placas TBX de la leche cruda de vaca contaminada artificialmente. Estas concentraciones se utilizaron para realizar la curva de calibración en matriz.

Tabla 13. Recuento microbiológico de Escherichia coli en leche cruda mediante la norma ISO-16649.

<i>Muestras de leche</i>	<i>Recuento por duplicado</i>		<i>u.f.c/mL</i>
<i>Muestra 1</i>	650	713	$6,8 \times 10^6$
<i>Muestra 2</i>	662	576	$6,2 \times 10^5$
<i>Muestra 3</i>	602	604	$6,0 \times 10^4$
<i>Muestra 4</i>	714	727	$7,2 \times 10^3$
<i>Muestra 5</i>	734	709	$7,2 \times 10^2$
<i>Muestra 6</i>	79	80	80
<i>Muestra 7</i>	9	9	9
<i>Muestra 8</i> (Control negativo)	0	0	

A continuación, en las siguiente Figura se pueden apreciar las colonias típicas de *E. coli* que crecieron en TBX.

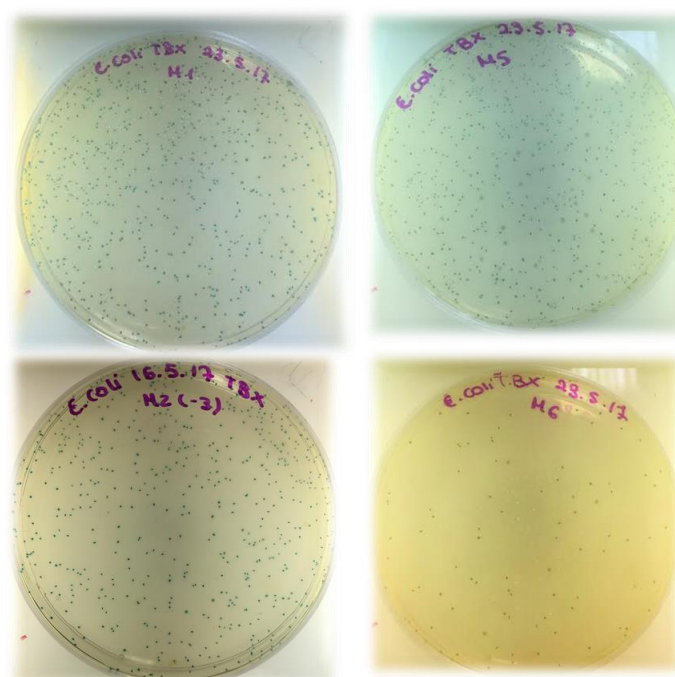


Figura 14. Fotografías colonias E. coli siembra en profundidad.

En la *Figura 15.e* representan gráficamente los Ct medios de cada una de las muestras de leche cruda contaminadas artificialmente (M1-M7) frente el logaritmo de la concentración de *E. coli* para cada muestra.

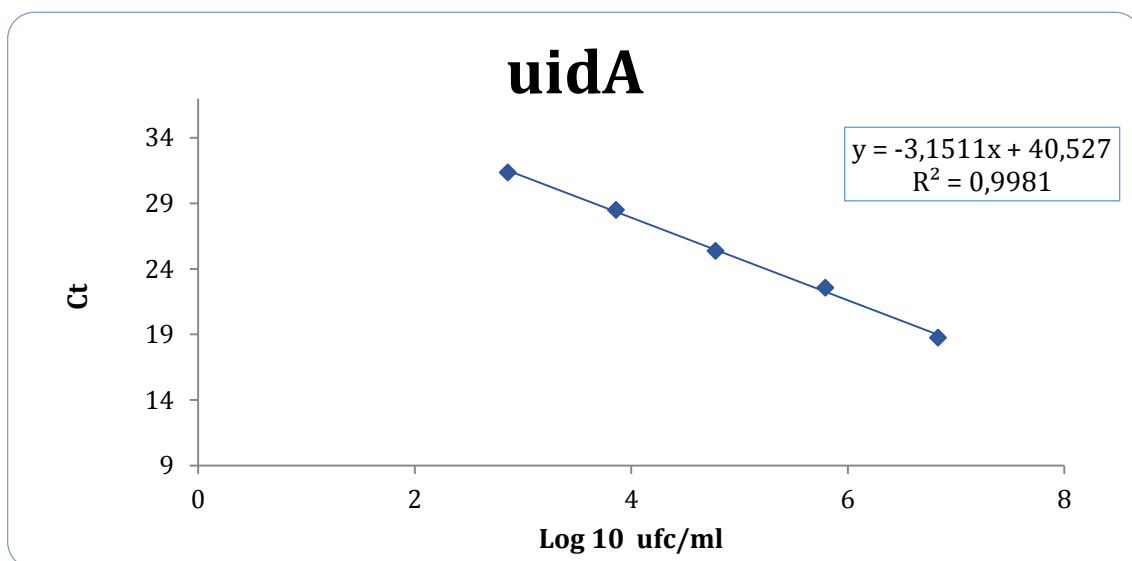


Figura 15. Curva de calibración en leche contaminada artificialmente.

Los resultados mostraron que el límite de cuantificación fue de $7,3 \times 10^2$ u.f.c./mL Este valor equivale a 108 copias del genoma de *E. coli* en la reacción de PCR, que se corresponde con un valor de Ct de $31,38 \pm 0,01$ (el número de copias se calculó teniendo en cuenta que se extrajo 10 mL del cultivo de *E. coli*, que fue eluído en 100 μ L y se amplificó un volumen de 1,5 μ L).

Respecto al límite de detección, este fue de 9 u.f.c/ ml, lo que equivale a un valor de Ct $31,11 \pm 0,05$, aunque dicho valor se encuentra fuera del rango lineal de la recta (ver resultados en Anejo 2).

A continuación, en la *Tabla 14* se muestran los resultados de las eficiencias de amplificación obtenidas a partir de la curva de calibración de leche.

Tabla 14. Eficiencia de amplificación PCR a tiempo real obtenidas para las muestras de la curva de calibración en leche.

	Pendiente	Eficiencia (%)	R ²
Gen uidA Repetición 1	-3,15	107,73	0,97
Gen uidA Repetición 2	-3,15	107,66	1,00
Gen uidA Repetición 3	-3,16	107,41	0,97

Como se puede observar las eficiencias están dentro de los valores aceptables. Las pendientes son muy similares entre ellas y presentan valores adecuados. Todas ellas tienen un índice de determinación cercano al valor de referencia (1,00), lo que indica que los puntos se ajustan correctamente a la recta.

Estudio comparativo entre las curvas de calibración celular y en leche cruda para el recuento de Escherichia coli.

Con el fin de evaluar el posible efecto matriz a la capacidad de amplificación del método desarrollado, se han representado de forma conjunta las curvas de calibración celular y en leche cruda (Figura 16).

Se observó que para la misma concentración de DNA amplificado, la curva realizada en leche cruda mostró una diferencia de 3 unidades en el Ct. Esto podría deberse a que la matriz es más compleja (composición, flora acompañante, presencia de inhibidores, etc.).

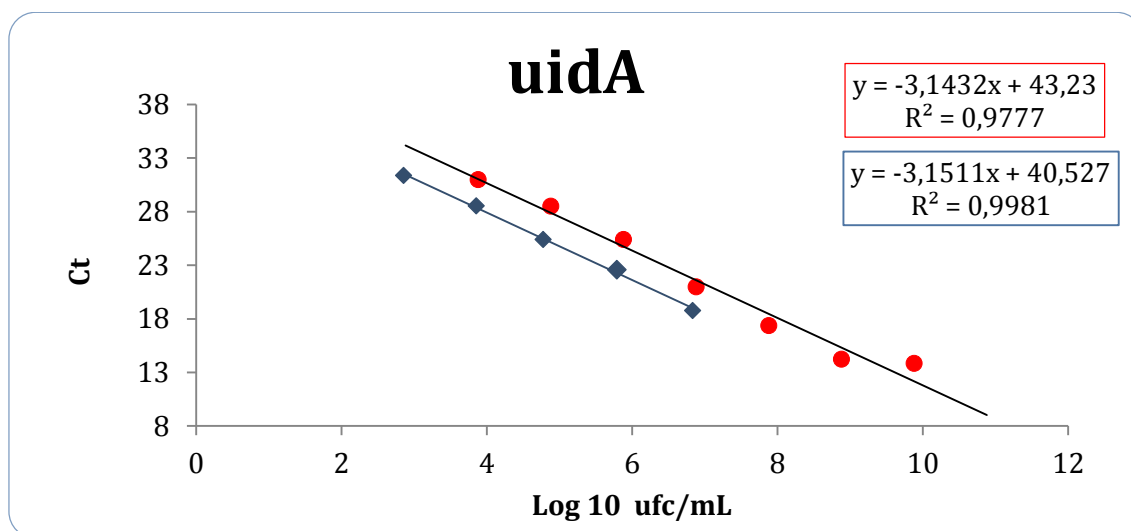


Figura 16. Curva de calibración celular y curva de calibración en leche.

Finalmente, en la Figura 17 se representa un ejemplo de una de las curvas de amplificación obtenidas mediante el CFX Maestro™ Software (Biorad) relativas a una curva de calibración en leche.

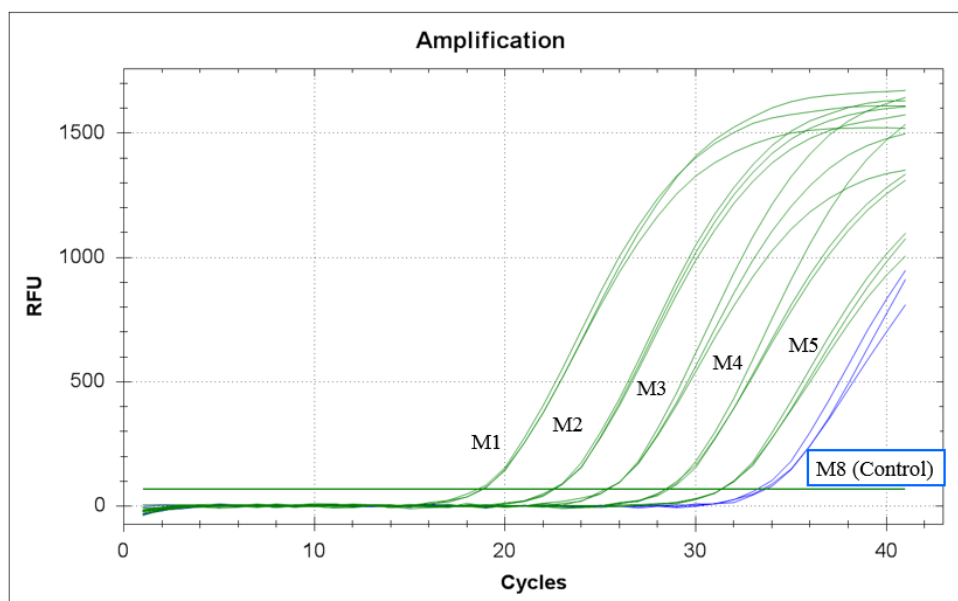


Figura 17. Curvas de amplificación de las muestras artificialmente contaminadas.

Se observa que el control negativo, el cual contenía leche cruda (M8 en azul), fue amplificado. El hecho de pudo deberse a la presencia de DNA proveniente de células muertas o viables no cultivables. Sin embargo, se corroboró que este DNA no correspondía a células viables ya que no se observaron colonias en el recuento en placa. Este hecho, además, podría explicar la diferencia de los valores de Ct observados entre la curva de calibración celular y la curva en leche (Figura 16).

Por ello, sería necesario el desarrollo de un método que pueda diferenciar entre las células vivas y las muertas.

5.3 REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD

5.3.1 Reproducibilidad

A continuación, se muestran los resultados de reproducibilidad obtenidos mediante dos réplicas de la técnica de contaminación de la leche, extracción y qPCR.

Tabla 15. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real ensayada en leche cruda (n=6).

Muestras	Ct primer cultivo	Ct segundo cultivo	Media	SD*	CV (%)
M1	17,35	18,67	18,01	0,66	3,67
M2	20,18	22,34	21,26	1,08	5,09
M3	23,81	25,45	24,63	0,82	3,32
M4	26,74	28,43	27,58	0,85	3,07
M5	30,24	31,19	30,71	0,47	1,54

*SD= desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 15, la reproducibilidad de la técnica medida realizando la repetición de todo el proceso mostró unos coeficientes de variación comprendidos entre 1,54 y 5,08%.

En la siguiente tabla se representan los resultados de reproducibilidad calculados a través de tres réplicas de qPCR realizados en tres días diferentes y procedentes de una extracción.

Tabla 16. Reproducibilidad del método de qPCR ensayada en leche cruda (n=9).

Muestras	Media Ct 3 repeticiones	SD*	CV (%)
M1	18,65	0,14	0,74
M2	22,47	0,12	0,53
M3	25,38	0,08	0,30
M4	28,45	0,06	0,23
M5	31,24	0,11	0,37

*SD = desviación estándar.

Los resultados muestran que en todas las muestras analizadas (M1-M5) la desviación estándar fue menor a 0,14 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación tuvieron un rango de 0,23 – 0,74%, indicando una buena reproducibilidad de la técnica estudiada.

En este caso se observa una menor variabilidad en los resultados que cuando se repitió todo el proceso (Tabla 15) debido a que en este último se encuentran implicados un mayor número de factores como el estado del cultivo inicial, el proceso de extracción, contaminación de la leche o el pipeteo en la qPCR.

5.3.2 Repetibilidad.

En la siguiente tabla se representan los resultados referentes a la repetibilidad de la técnica PCR a tiempo real desarrollada.

Tabla 17. Repetibilidad del método de PCR a tiempo real ensayada en leche cruda ($n=3$).

Muestra	Placa 1			Placa 2			Placa 3		
	C_t	SD^*	CV (%)	C_t	SD	CV (%)	C_t	SD	CV (%)
M1	18,67	0,10	0,55	18,78	0,16	0,83	18,50	0,06	0,34
M2	22,34	0,03	0,14	22,57	0,07	0,29	22,50	0,03	0,15
M3	25,45	0,15	0,60	25,40	0,07	0,26	25,30	0,14	0,54
M4	28,43	0,11	0,37	28,52	0,10	0,36	28,39	0,17	0,60
M5	31,19	0,14	0,44	31,38	0,01	0,03	31,17	0,28	0,91

*SD = desviación estándar.

Se puede observar que en todas las muestras analizadas (M1-M5) la desviación estándar fue menor a 0,3 ciclos de amplificación. Así mismo, los coeficientes de variación fueron bajos (Allen, Payne, Harville, Cohen, & Russell, 2007; Karlen, McNair, Perseguers, Mazza, & Mermod, 2007), cuyos valores presentaron un rango de 0,14% - 0,91%.

6 CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- En este trabajo se ha puesto a punto un método preciso y sensible de PCR a tiempo real para el recuento de *E. coli* en leche cruda como microorganismo indicador de contaminación fecal.
- El límite de cuantificación alcanzado fue de $7,3 \times 10^2$ u.f.c/mL, lo que se corresponde con 108 copias del genoma de *E. coli* en la reacción de PCR, que mostró valores de eficiencia cercanos al 100% y un valor de Ct de $31,38 \pm 0,01$.
- Este método es una alternativa más rápida (5 - 7 horas) de recuento de *E. coli* en leche cruda frente a los métodos convencionales (24 - 48 horas), aportando una herramienta eficaz para mejorar el control de la higiene en las industrias lácteas.
- Las diferencias obtenidas entre las curvas de calibración celular y en leche cruda, ponen de manifiesto la necesidad de realizar la evaluación de las metodologías de análisis en matriz, para determinar su influencia.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcalde, L. (2012). Evaluación y gestión del riesgo asociado a la reutilización de aguas residuales. Universitat de Barcelona.
- Allen, C. A., Payne, S. L., Harville, M., Cohen, N., & Russell, K. E. (2007). Validation of quantitative polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine macrophages. *Journal of Immunological Methods*, 328(1-2), 59-69. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2007.08.006>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Pate, H. R. (2000). Basic Principles of Quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, 15(2), 115-122. <http://doi.org/10.1385/MB:15:2:115>
- Banco nacional de ADN. (2017). Programa de control de calidad de muestras. Recuperado 22 de mayo de 2017, a partir de <http://www.bancoadn.org/control-de-calidad.html>
- Blanco, J. (2012). *Escherichia coli* enteroagregativa O104: H4- ST678 productora de Stx2a. Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/ VTEC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), 84-89.
- Cadenas, M. (2013). Validación de un nuevo método molecular para el estudio de la viabilidad celular de *Legionella pneumophila* en muestras ambientales. Universidad de Alicante.
- Castillo, A. P. (2014). Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo. Universidad nacional de colombia.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305. <http://doi.org/10.1157/13059826>
- Cultimed. (2017). Manual básico de microbiología-Cultimed. Recuperado a partir de www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf%0A
- Dos Santos, A. (2007). Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. ACRIBA.
- DSMZ: Prokaryotic Nomenclature Up-to-date. (2016). Recuperado 8 de junio de 2017, a partir de <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>
- ELIKA. (2013). *Escherichia Coli*. Recuperado a partir de http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf
- FAO. (2012). Prevención de la E.coli en los alimentos, 12.
- Farfán, A. E., Ariza, S. C., Vargas, F. A., & Vargas, L. V. (2016). Mecanismos de

- virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>
- Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Ferrús, M. A., Barat, J. M., Conchello, M. P., Guix, S., & Palop, A. (s. f.). Revista del comité científico de la Aecosan número 21. Recuperado a partir de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/LECHE_CRUDA.pdf
- Frazier, W. ., & Westhoff, D. . (1993). *Microbiologia de los Alimentos* (Acriba S.A).
- Griful, E., & Canela, M. A. (2005). *Gestión de la calidad*. Barcelona: Edicions UPC.
- Herrera, A. (2015). El papel de los alimentos en la transmisión de *Escherichia coli* potencialmente patógenas para el hombre: prevalencia y caracterización de cepas diarregénicas y productoras de β - lactamasas de espectro extendido.
- Herrera, R. A., & González, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Abril-Junio*, 69(2), 69-76.
- Higiene ambiental. (2015). AENOR publica una nueva norma para la detección y el recuento de *Escherichia coli*. Recuperado 11 de junio de 2017, a partir de <http://www.higieneambiental.com/higiene-alimentaria/aenor-publica-una-nueva-norma-para-la-deteccion-y-el-recuento-de-escherichia-coli>
- Jay, J. M. (1992). *Microbiologia moderna de los alimentos*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 131. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131>
- Laboratorios Conda. (2010). TBX chromogenic Agar ISO 16649-2,2. Selective medium for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in foods.
- Larrea, J. A., Rojas, M. M., Romeu, B., Rojas, M., & Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas : revisión de la literatura, 44(3), 24-34.
- Lázaro, P. (2009). Formación de biopelículas por *Escherichia Coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Universidad computense de Madrid.
- Lizzi, M., & Herrera, S. (2011). Pruebas Microbiológicas para *E. coli* | Biota et Scientia.
- Lluque, A., Mercado, E., Riveros, M., Alvarado, L., Carlos, E., Colichón, A., Ochoa, T. (2010). Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). *Rev. Gastroenterol. Perú*, 30(2), 121-125.

- Martín, I. (2017). *Escherichia coli*. Recuperado 6 de mayo de 2017, a partir de http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=116&Itemid=135
- Monllor, F. (2013). Desarrollo y validación de un nuevo sistema de detección molecular basado en qPCR de *Legionella* spp. en muestras ambientales. Universidad de Alicante. Recuperado a partir de <https://iuaca.ua.es/es/master-agua/documentos/-gestadm/trabajos-fin-de-master/tfm-2013-nuria-ferrando.pdf>
- NCBI, N. C. for B. I. (2017). *Escherichia coli* strain SWG-9 UidA (uidA) gene, partial cds - Nucleotide. Recuperado 2 de junio de 2017, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT311783.1>
- Nolan, M. J., Tomley, F. M., Kaiser, P., & Blake, D. P. (2015). Quantitative real-time PCR (qPCR) for *Eimeria tenella* replication - Implications for experimental refinement and animal welfare. *Parasitology International*, 64(5), 464-470. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2015.06.010>
- Nore, A., Ximena, L., Sanchez, P., & Alexandra, J. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm tm 3m tm para el análisis de alimentos.
- Otero, V. (2014). Incidencia, comportamiento y control de tipos patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche y queso de oveja. Universidad de León.
- Palomino, C., & González, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 31(3), 535-46.
- Pennington, T. (2010). Human, Ecological and Biophysical Dimensions of Tropical Dry Forests, 35, 632.
- Prescott, Harley, & Klein. (2004). *Microbiología*. Mcgrae Hill.
- Romeu, B. (2012). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana.
- Sergio, D., Maria, L., Benetti, S., Fay, F., Fay, O., Cibic, L., ... Rosario, C. S. a. (2006). Avances en el Diagnóstico Molecular : reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Anuario Fundación Dr. J.R Villavicencio*, (XIV), 33-37.
- Signorini, M. L., Sequeira, G. J., Bonazza, J. C., Dalla Santina, R., Martí, L. E., Frizzo, L. S., & Rosmini, M. R. (2008). Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción de leche, 2, 207-217.
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Santander, L., Silva, C., & Eguiarte, L. E. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*, 26(10).
- Todar, K. (2008). Pathogenic *E. coli*: Online textbook of bacteriology.
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., ... Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32-44.

<http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>

Wang, H., Gill, C. O., & Yang, X. (2014). Development of a real-time PCR procedure for quantification of viable *Escherichia coli* in populations of *E. coli* exposed to lactic acid, and the acid tolerance of verotoxigenic *E. coli* (VTEC) from cattle hides. *Food Control*, 43, 104-109. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.039>

Yang, X., Badoni, M., & Gill, C. O. (2011). Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. *Food Microbiology*, 28(8), 1478-1482. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.013>

ANEJO 1: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Infusión de cerebro y corazón (BHI) y agar BHI

Para su elaboración se pesaron 37 gramos del medio BHI (Pronadisa) y se disolvieron en 1 L de agua destilada caliente, agitándolo. Una vez homogenizado, el medio se autoclavó durante 20 minutos a 121°C. Su composición es la siguiente:

Infusión de corazón de porcino	10,0 g/L
Cloruro sódico	5,0 g/L
Peptona de gelatina	10,0 g/L
Fosfato di sódico	2,5 g/L
Infusión de cerebro de porcino.....	7,5 g/L
Dextrosa	2,0 g/L

El pH final a 25 $7,4 \pm 0,2$ a 25°C

Para la elaboración de agar BHI, se incorporan 15 g de agar bacteriológico al medio, siguiendo las mismas especificaciones para esterilizarlo. Una vez preparado se esperó hasta que alcanzara 40°C para su uso.

Agua de peptona

Se preparó una disolución de agua de peptona (Pronadisa) al 0,1% con agua destilada previamente calentada y agitándolo frecuentemente. Una vez homogenizado, el medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Triptona	10,0 g/L
Cloruro sódico	5,0 g/L

El pH final es de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

TBX (Brain Heart Infusion Broth)

El medio se preparó pesando 36,6 g de TBX sólido (Pronadisa) y disolviéndolo en 1 L de agua destilada caliente agitándolo repetidamente. Antes de su uso se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Peptona de caseína.....	20,00 g/L
X-β-Glucuronide	0,075 g/L
Sales biliares N°3	1,50 g/L
Agar bacteriológico	15,00 g/L

EL pH final es de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

ANEJO 2: RESULTADOS DE PCR A TIEMPO REAL

Rango dinámico de concentración de DNA

Tabla 18. Valores medios $Ct \pm SD$ obtenidos en las muestras de DNA utilizadas para realizar el rango dinámico.

<i>Cantidad muestra (ng)</i>	<i>Media Ct</i>	<i>SD*</i>
7,34E+01	11,93	0,30
7,34E+00	15,11	0,14
7,34E-01	18,33	0,30
7,34E-02	21,56	0,21
7,34E-03	24,74	0,28
7,34E-04	27,83	0,07
7,34E-05	31,52	0,36
7,34E-06	33,86	0

*SD = desviación estándar.

Tabla 19. Concentración DNA curva estándar.

<i>Concentración de muestra</i>	<i>Rango A260/A280</i>
48,9 ng/ μ L	1,85

Cálculo concentración DNA para la recta estándar:

$$\frac{48,9 \text{ ng}}{1 \mu\text{L}} = \frac{X}{1,5 \mu\text{L}}$$

$$X = 73,35 \text{ ng}$$

Curva de calibración celular

Tabla 20 Valores medios Cts \pm SD obtenidos en las muestras de DNA utilizadas para realizar la curva celular.

<i>Dilución</i>	<i>ufc/mL</i>	<i>Media Ct</i>	<i>SD*</i>
0	7,60E+09	13,83	0,02
10 ⁻¹	7,60E+08	14,22	0,13
10 ⁻²	7,60E+07	17,36	0,14
10 ⁻³	7,60E+06	20,97	0,14
10 ⁻⁴	7,60E+05	25,38	0,09
10 ⁻⁵	7,60E+04	28,49	0,09
10 ⁻⁶	7,60E+03	30,97	0,27
10 ⁻⁷	7,60E+02	31,20	0,10
10 ⁻⁸	7,60E+01	31,07	0,08

*SD = desviación estándar.

Curva de calibración en leche

Tabla 21. Valores medios Cts \pm SD obtenidos en las muestras de DNA utilizadas para realizar la curva en leche.

*SD= desviación estándar.

<i>Muestras</i>	<i>ufc/mL</i>	<i>Media Ct</i>	<i>SD*</i>
M1	6,80E+06	18,78	0,16
M2	6,20E+05	22,57	0,07
M3	6,00E+04	25,40	0,07
M4	7,20E+03	28,52	0,10
M5	7,20E+02	31,38	0,01
M6	8,00E+01	27,89	0,13
M7	9,00E+00	31,11	0,05
M8	0,00E+00	33,50	0,2282

*SD = desviación estándar.