



Enrichment-improvement in the effectiveness of the implementation of the polymerase chain reaction of pathogens in food

Title in Spanish: *Enriquecimiento-mejora en la eficacia de la realización de la reacción en cadena de la polimerasa de patógenos en alimentos*

J. Cuadrado^{1*}, C. Cuadrado², B. Cuadrado³

¹Laboratorio de Salud Pública de Jaén. Junta de Andalucía. Paseo de la Estación 21, 1ª Planta, 23008, Jaén, España.

²Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas 23009, Jaén, España. ³Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja 18071, Granada, España.

ABSTRACT: Objective. Improve the effectiveness of the tests by qualitative polymerase chain reaction (PCR) of pathogens in food. When performing an enrichment consists in making a lower dilution to the 1/10 is intended to bring forward in time, reduce the cost of media, it seeks to enable the complete up to 100% of the samples to perform in a PCR and does not decrease the load cell Diana of the food. Methods. Investigation of the presence or absence of a pathogenic bacterium in food and its concentration per millilitre of dissolution, following the traditional method in different dilutions, in two different types of food. Results. The results obtained in the experiment with a pathogen in food, evidence that using dilutions lower than 1/10, the bacterial concentration for a minimum number of hours of incubation anticipates the detection by PCR of deoxyribonucleic acid (DNA) target, with values of cfu/ml above 1×10^3 . Therefore the incubation time in an enrichment broth and the volumes of the solutions are reduced. And it is only needed one operator and one incubator for all tasks. Conclusions. The efficacy increases because are needed less material and working hours. Testing more samples in the same working day (makes possible to perform all samples that supports the thermal cycler for each start-up) the analysis time decreases in seven hours at least.

RESUMEN: Objetivo. Mejorar la eficacia de los ensayos cualitativos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de patógenos en alimentos. Al realizar un enriquecimiento consistente en hacer una dilución inferior a la 1/10 se pretende adelantar en tiempo, reducir el gasto de medios, se procura posibilitar el completar hasta el 100% las muestras a realizar en una PCR y no disminuir la carga celular diana del alimento. Métodos. Investigación de la presencia o ausencia de una bacteria patógena en un alimento y su concentración por mililitro de disolución, siguiendo el método tradicional a distintas diluciones, en dos matrices. Resultados. Los resultados obtenidos en el experimento con un patógeno en alimentos, evidencia que con diluciones inferiores a 1/10, la concentración bacteriana para un mínimo de horas de incubación adelanta la detección por PCR del ácido desoxirribonucleico (ADN) diana, con valores de ufc/ml por encima de 1×10^3 . Por tanto el tiempo de incubación en un caldo de enriquecimiento se acorta, así como los volúmenes de las disoluciones a incubar. Y de este modo solo es necesario un operario y una estufa de incubación para realizar todas las tareas. Conclusiones. Mayor eficacia al necesitarse menos medios materiales y horas de trabajo. Realización de mayor número de muestras en una misma jornada de trabajo (se posibilita realizar el total de muestras que admite el termociclador por cada puesta en funcionamiento), se acorta el tiempo de análisis en siete horas como mínimo.

*Corresponding Author: jose.cuadrado@juntadeandalucia.es

Received: January 6, 2015 Accepted: January 25, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 1 (2016), pp. 9-13

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la técnica por PCR, cada vez son más numerosos los técnicos y/o gerentes que implantan dichos métodos en sus laboratorios, (demostrado por el aumento de participaciones en ensayos intercomparativos con estas técnicas y en el número de artículos que desarrollan esta metodología). Una de las principales ventajas de las técnicas moleculares es la reducción del tiempo de análisis, pudiendo ser de días en algunas determinaciones, por ejemplo, con un método tradicional de investigación de *Listeria monocytogenes* según UNE EN ISO 11290-1:1997/A1: 2005, la duración del ensayo

sería de cuatro días para una muestra con presencia y siete días para una con ausencia (en el mejor de los casos para ambas), con la técnica PCR para la misma determinación, el tiempo no excedería de dos días (1).

A la hora de realizar un ensayo de PCR para la determinación de patógenos en alimentos suele estar indicado el enriquecimiento de la muestra (2,5).

¿Qué importancia tiene en una investigación (por ejemplo para la determinación de *Salmonella spp*), la cantidad exacta de diluyente añadido (225 ml de agua de peptona tamponada (BPW) para 25 g de muestra) a la hora de detectar todas las posibles bacterias diana existentes en

la porción de muestra? ¿Podríamos añadir una cantidad mayor o menor de diluyente, con la posibilidad de abaratar costes y procesar mayor número de muestras en el menor tiempo posible?

¿Cuántas unidades formadoras de colonias (ufc) teóricas de la bacteria diana detectaríamos en el aislamiento final en placa? ¿Disminuye la eficacia detectora de patógenos en alimentos mediante la técnica por PCR, si no se realiza enriquecimiento de la muestra? ¿Disminuye igualmente la detección si se realiza enriquecimiento según indican los procedimientos de investigación tradicionales en base a normas internacionales de estandarización? ¿Disminuye igualmente la detección si se realiza enriquecimiento con alguna modificación en cuanto a dilución, tiempo de incubación para las determinaciones de investigación? Partiendo de un alimento, como puede ser una muestra de carne fresca de porcino de 25 g, consideramos que si ésta, tuviese una bacteria de *Salmonella* en esos 25 g, con la posible flora acompañante, los nutrientes de la muestra, serían suficientes para la reproducción de los microorganismos presentes, sin embargo, en caso de que la flora acompañante competitiva existiese de manera sobreabundante, podría llevarnos a pensar que su supervivencia estaría comprometida, por lo cual, añadimos nutrientes en abundancia y condiciones favorables para su reproducción, ¿cuáles? En la fase de enriquecimiento para la determinación de *Salmonella spp* se adiciona habitualmente, agua de peptona tamponada que aporta además de proteínas, cloruro de sodio, hidrógeno fosfato disódico dodecahidratado y dihidrógeno fosfato de potasio. Esta etapa se da a temperatura óptima 37 ± 1 °C y tiempo adecuado de 16 a 20 horas (3). Los cálculos realizados para obtener la concentración bacteriana (tabla 2) parten del tiempo de generación para *Salmonella typhimurium* en un medio con aminoácidos y sales (agua de peptona tamponada), considerando así la tasa de crecimiento de *Salmonella* de 20-30 minutos (4,5).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material y aparatos

- Balanza o delta dilutor.
- Probetas de vidrio de 100-250 mL.
- Pipetas estériles de 1 mL.
- Homoginizador (stomacher).
- Asas de cultivo estériles.
- Mechero de gas.
- Bolsas de stomacher estériles con filtro y soporte para incubar.
- Tijeras, pinzas, bisturí, hojas, cucharilla u otro material similar para manipular las muestras.
- Estufas de cultivo calibradas a las temperaturas de incubación que corresponda.

2.2. Reactivos y medios de cultivo

- Agua de peptona tamponada.

-Caldo de enriquecimiento Muller-Kauffmann tetracionato-novobiocina y Rappaport-Vassiliadis con soja.

-Medio de aislamiento selectivo diferencial, XLD y otro apropiado para aislar *Salmonella spp*.

-Sistema de identificación bioquímica y antisueros específicos.

2.3. Planteamiento

En las normas internacionales de estandarización (6) se contempla la posibilidad de enriquecer la muestra en un medio nutritivo para favorecer el crecimiento de los microorganismos diana. Es frecuente el enriquecimiento con caldo a la temperatura adecuada a cada microorganismo, durante 24 horas (7,8,9,10,11,12) en los ensayos de PCR para detectar bacterias patógenas en los alimentos. Realizar enriquecimientos 24 horas a 30, 35, 37 °C según métodos tradicionales de investigación por la International Organization for Standards (ISO) para realizar ensayos mediante PCR conlleva:

Un día más en la finalización del análisis.

225 ml de caldo por muestra.

Procesamiento de 10 a 20 bolsas de stomacher como máximo (250 ml por muestra) por estufa de cultivo (de unos 50 litros de capacidad).

Necesidad de cinco o más estufas de 50 litros, para obtener un 100% de rendimiento en los ensayo de PCR, ya que estos pueden procesar noventa y seis muestras por análisis(13).

-No es obligatorio pero sí adecuado enriquecer la muestra (5).

-Si se disminuyese el volumen de solvente, se podrían procesar más muestras en menos tiempo y con menos requerimientos físicos (reactivos, materiales, equipos, tiempo, personal).

-La preparación de noventa y seis muestras para la PCR (14,13) y el análisis mediante esta técnica conlleva no más de dos horas y treinta minutos (15).

2.4. Experimento

Con estos acontecimientos, se realiza un experimento consistente en ver si la carga de microorganismos diana es mayor de 10^3 /ml de una solución cuyo volumen no sea superior a 100 ml e inferior a 50 ml y en la que esté presente el alimento a razón de 25 g, homogeneizado y disuelto en caldo de enriquecimiento apropiado, no superando los volúmenes indicados. Se utilizan dos matrices, una sólida y otra líquida, se realiza un ensayo para cada matriz con el fin de ver que la muestra natural no tenga contaminación del patógeno diana, se realizan en ambas matrices ensayos repetidos a distintas diluciones y contaminando la muestra con lenticulas de la national collection of types culteres (NCTC) certificadas y a la concentración más baja posible detectada en el laboratorio.

2.5. Procedimiento operativo de análisis

Realizar cada uno de los ensayos como se relacionan siguiendo la ISO 6579:2003 (ver Tabla 1).

Enrichment-improvement in the effectiveness of the implementation of the polymerase chain reaction of pathogens in food

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, utilizando BPW como medio de enriquecimiento con el fin de conocer si la muestra natural está contaminada o no.

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, sin añadir BPW, dopada con 4 ufc de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023 /25ml (Límite de detección (LD) del método en el laboratorio) y realizando tres determinaciones iguales.

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, tras añadir a la muestra 225 ml de BPW, con el mismo dopaje y solo en una unidad de muestra.

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, tras añadir a la muestra 75 ml de BPW, con el mismo dopaje y en dos unidades.

-Determinación de *Salmonella spp* en una muestra natural de 25 g de paté de cerdo, para ver si la muestra está

o no contaminada.

-Determinación de *Salmonella spp* en una muestra de paté de cerdo (25g) dopada con 4 ufc/25 g de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023, con 225 ml de BPW.

-Determinación de *Salmonella spp* en una muestra de paté de cerdo (25g) dopada con 4 ufc/25 g de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023 (LD del método en el laboratorio), con 50 ml de BPW y por triplicado.

2.6. Obtención de datos y conclusiones

Los ensayos los realiza un analista distinto al que dopa. En todas las placas sembradas de las muestras dopadas, el crecimiento de colonias sospechosas de *Salmonella spp* ha sido abundante.- Determinación de *Salmonella spp* en una muestra de paté de cerdo (25g) dopada con 4 ufc/25 g de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023, con 75 ml de BPW y por duplicado.

Tabla 1. Alimentos dopados a distintas diluciones.

Matriz	Peso en g	Enriquecimiento con BPW en ml	Nº ensayos	Dopaje en Ufc/25 g	Resultado
Leche deshidratada lactantes	25	225	1	0	Ausencia
		225	1	4	Presencia
		0	3	4	3 Presencias
		75	2	4	2 Presencias
Paté de cerdo	25	225	1	0	Ausencia
		225	1	4	Presencia
		50	3	4	3 Presencias
		75	2	4	2 Presencias

Como se ve en la Tabla 1, las muestras naturales sin dopar resultaron negativas a *Salmonella spp*, y en el resto (las dopadas) se dio la presencia de *Salmonella spp*, apareciendo así en todas las muestras menos diluidas. Si se realiza el cálculo del número teórico de células del

patógeno diana en un mililitro de caldo para a partir de ahí realizar la extracción del ADN, considerando la tasa de crecimiento de *Salmonella spp* de 2 (60/30) (4) podemos establecer la Tabla 2 (16):

Tabla 2. Concentración de células diana por ml de disolución a distintas diluciones.

Minutos	Horas	Número células/muestra	log	Células diana (<i>Salmonella spp</i>) /ml de la dilución 1/4 procedente de 25g-ml de alimento	Células diana (<i>Salmonella spp</i>) /ml de la dilución 1/3 procedente de 25g-ml de alimento
0	0	1	0	Menos de 10	Menos de 10
30	0,5	2	0,3	Menos de 10	Menos de 10
60	1	4	0,6	Menos de 10	Menos de 10
90	1,5	8	0,9	Menos de 10	Menos de 10
120	2	16	1,2	Menos de 10	Menos de 10
180	3	64	1,8	Menos de 10	Menos de 10
240	4	256	2,4	Menos de 10	Menos de 10
300	5	1024	3,01	Menos de 10 ²	Menos de 10 ²
360	6	4096	3,61	Menos de 10 ²	Menos de 10 ²
420	7	16384	4,21	Menos de 10 ³	Menos de 10 ³
480	8	65536	4,81	Menos de 10 ³	Menos de 10 ³
540	9	262144	5,41	2,6x10 ³	3,4x10 ³
600	10	1048576	6,02	1x10 ⁴	1,3x10 ⁴
660	11	4194304	6,62	4,1x10 ⁴	5,5x10 ⁴
720	12	16777216	7,22	1,6x10 ⁵	2,2x10 ⁵
840	14	268435456	8,42	2,6x10 ⁶	3,5x10 ⁶
960	16	4,3x10 ⁹	9,63	4,3x10 ⁷	5,7x10 ⁷

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

Los resultados obtenidos en el experimento evidencian que para alimentos como la leche y el paté diluidos a 1/3 y 1/4, la concentración bacteriana para un mínimo de 9 horas de incubación facilita la detección por PCR del ADN diana, con valores de ufc/ml superiores a 1x10³.

Las muestras analizadas con dilución 1/10, propia de los métodos tradicionales de investigación, han tenido similares resultados.

3.2. Discusión.

El realizar una dilución inferior a 1/10 no contradice la ISO 22174 ya que el fin de incrementar el número de células del patógeno se cumple y permite la detección de un número bajo de microorganismos diana al incrementar estos con el enriquecimiento.

4. CONCLUSIONES

Esta sencilla labor conlleva repercusiones como:

- Menor consumo de reactivos (caldos de enriquecimiento).
- Menos horas de incubación.

-Adelanto en tiempo de los resultados analíticos.

-Menores necesidades de equipos (incubadores) y fungibles (por ejemplo bolsas de stomacher más pequeñas).

-Procesamiento de noventa y seis muestras por termociclado.

-Actuación de un único analista.

Otro tipo de experimentos se podrían realizar en base a conseguir determinadas mejoras distintas o mayores a las aquí descritas, como barajar el disminuir el tiempo de incubación sin que los resultados se vean afectados, u organizar la secuencia de trabajo para que con pequeños cambios como el de bajar la dilución se consiga mayor eficacia analítica

5. REFERENCIAS

1. Gattuso A et al. Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *Int J Food Microbiol.* 2014 Aug 1;184:106-8.
2. Margie D. Lee1, Amanda Fairchild1. *PCR Methods in Foods.* Editors: John Maurer. 2006 Chapters 3 Sample Preparation for PCR.

3. UNE EN ISO 6579:2003 Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*
4. John. L. Ingraham, Catherine A. Ingraham. Introducción a la Microbiología Tomo I Ed Reverté S.A. 2004.
5. Zinsser H, Wolfgangk K et al. Microbiología. Editorial Médica Panamericana. 1995.
6. UNE EN ISO 22174:2005 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones.
7. Sails AD et al. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Mar;69(3):1383-90.
8. Bohaychuk VM et al. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J Food Prot.* 2007 May;70(5):1080-7.
9. M. Radhika, Majumder Saugata, H.S. Murali, and H.V. Batra. A novel multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella enterica* and *Shigella* species. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(2): 667–676. Published online 2014 Aug 29. PMID: PMC4166298.
10. Kamil M. AL-Jobori and Ali K. AL-Bakri Kamil M. AL-Jobori and Ali K. AL-Bakri. Comparison between PCR and Culture Methods for Detection of *Salmonella typhimurium* from Food and Beverage. *Donnish Journal of Food Science and Technology Vol 1(2)* pp. 006-016 August, 2015.
11. Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., and Comi, G. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 103(2):167–78. 2005.
12. Hiroshi Fukushima, Kazunori Katsube, Yukiko Hata, Ryoko Kishi, and Satomi Fujiwara. Rapid Separation and Concentration of Food-Borne Pathogens in Food Samples Prior to Quantification by Viable-Cell Counting and Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan; 73(1): 92–100. Published online 2006 Oct 20. doi: 10.1128/AEM.01772-06 PMID: PMC179711413- David Rodríguez Lázaro. Development of molecular-based techniques for the detection, identification and quantification of food-borne pathogens. 2004. ISBN: 84-688-8617-3 tabla I.5
14. Josefsen, Mathilde Hartmann. Molecular detection of foodborne pathogens. 2009. Frederiksberg: Samfundslitteratur.
15. C. Longhi, A. Maffeo, M. Penta, G. Petrone, L. Seganti and M.P. Conte. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 94, 879–885
16. Thomas D. Brock, Michael T. Madigan. Microbiología. Prentice Hall. 1993.