



Artículo

Detección de *Salmonella* en lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa

Detection of *Salmonella* in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) by
Polymerase Chain Reaction

Cecilia Casabonne*, Sonia Tomasiello, Virginia Aquili, Agustina González, Tomás Subils,
Claudia Balagué

Universidad Nacional de Rosario (UNR), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas,
Departamento de Microbiología, Área Bacteriología. Suipacha 531, Rosario, Argentina.

*Autora para correspondencia: ccasabonne@fbioyf.unr.edu.ar

Aceptado 06-Enero-2018

Resumen

La metodología de referencia para la búsqueda de *Salmonella* es el cultivo tradicional, sin embargo, es una técnica laboriosa y requiere varios días de procesamiento. Los métodos genotípicos resultan una alternativa eficaz frente a esta problemática. El objetivo de este trabajo fue evaluar la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *Salmonella* en muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) para su implementación en un laboratorio de microbiología de alimentos de la ciudad de Rosario, Argentina. Se empleó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detección del gen *invA* como marcador de *Salmonella* spp. Se realizó la validación de la técnica mediante la determinación de la inclusividad, la exclusividad y el límite de detección. El límite de detección fue de 1,0 µg/mL de ADN. La técnica presentó una inclusividad y una exclusividad del 100 % y exhibió un grado de concordancia muy bueno con respecto a la técnica de cultivo. Este trabajo permitió demostrar la factibilidad en el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detección de *Salmonella* en muestras de lechuga; sin embargo, es necesario estandarizar esta metodología de acuerdo a las condiciones de cada laboratorio y del alimento a procesar para asegurar su validez diagnóstica.

Palabras claves: *invA*, lechuga, RCP, *Salmonella*, tamizaje, validación.

Abstract

The reference methodology to investigate *Salmonella* is traditional culture, however, it is a laborious technique and requires several days of processing. Genotypic methods are an effective alternative to this problem. The aim of this study was to develop a *Salmonella* detection method based on Polymerase Chain Reaction in lettuce samples (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) for its implementation in a microbiology laboratory in the city of Rosario, Argentina. The Polymerase Chain Reaction technique was used for the detection of the *invA* gene because it is specific to the *Salmonella* genus. Validation was performed by the determination of inclusivity, exclusivity, and limit of detection. The limit of detection was 1.0 µg/mL DNA. The technique presented an inclusivity and exclusivity of 100 %, and showed a very good degree of agreement with respect to the cultivation technique. This work allowed us to demonstrate the feasibility of using Polymerase Chain Reaction to detect *Salmonella* in lettuce samples; however, it is necessary to standardize this methodology according to the conditions of each laboratory and of the food to be processed to ensure its diagnostic validity.

Key words: *invA* , lettuce, PCR, *Salmonella*, screening, validation.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) han sido catalogadas por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el problema de salud pública más diseminado en el mundo contemporáneo. La OMS estimó que, en el año 2005, murieron aproximadamente 1,8 millones de personas debido a enfermedad diarreica asociada a la ingesta de agua o alimentos contaminados (Barrantes y Achí, 2011).

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes, en niños de corta edad y en ancianos, por lo que se la considera de alto impacto para la salud pública. La transmisión de *Salmonella* ocurre a través de aguas, alimentos contaminados y de persona a persona (Eley, 1994; Caffer *et al.*, 2008).

La presencia de *Salmonella* en un alimento se considera peligrosa y, por lo tanto, no apto para el consumo humano. A pesar de los controles que se han puesto en práctica, las infecciones por *Salmonella*, debidas al consumo de alimentos contaminados, continúan siendo

un problema serio con millones de casos que ocurren anualmente en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas (Parra *et al.*, 2002; Caffer *et al.*, 2008).

En Estados Unidos, en el período 1996-2006, *Salmonella* fue uno de los patógenos frecuentemente relacionado con ETA. En este país, durante el 2005 y el 2006 se registraron 4 brotes por consumo de tomate, con 459 casos de salmonelosis confirmados por cultivo, mientras que en el año 2006 se registraron 121 brotes, con más de 3300 casos (Barrantes y Achí, 2011).

En Europa, entre 1990-1992, *Salmonella* fue responsable del 83 al 87 % de los brotes de ETA registrados. Su presencia se detectó en vegetales frescos de exportación (lechugas, mostaza, albahaca, tubérculos, entre otros), con una frecuencia de 1,9 a 8,0 % (Barrantes y Achí, 2011).

En Argentina, entre las bacterias frecuentemente asociadas a ETA se encuentran *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. En nuestro país, durante el período 2010-2012, en el Laboratorio Nacional de Referencia se

caracterizaron y subtipificaron aislamientos relacionados con 11 brotes alimentarios causados por *Salmonella* spp. (64 % por *Salmonella* Typhimurium) (DB-INEI *et al.*, 2012).

Por ello, la vigilancia de *Salmonella* spp. en todas las etapas de la cadena de procesamiento de los alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis transmitida por alimentos y en el desarrollo e implementación de estrategias eficientes de control de esta enfermedad (Caffer *et al.*, 2008).

En los programas de monitoreo y control es esencial contar con métodos de laboratorio eficientes para el aislamiento, identificación y tipificación de *Salmonella* spp. Tradicionalmente, los métodos microbiológicos empleados para detectar patógenos en los alimentos han sido métodos basados en el cultivo microbiológico. Puntualmente, el método tradicional de detección de *Salmonella* comprende 4 fases: una primera fase de pre-enriquecimiento no selectivo, una segunda fase de enriquecimiento selectivo, un paso adicional de aislamiento en medios sólidos selectivos, y una última fase de confirmación mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Estos procesos tradicionales de cultivo son laboriosos y complejos en su procesamiento y prolongan la obtención de los resultados hasta una semana (Li y Mustapha, 2004; Jasson *et al.*, 2010).

Como una alternativa a esta problemática, el desarrollo de las técnicas de biología molecular para la detección de microorganismos, fundamentalmente los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa ('Polimerase Chain Reaction'), o PCR, por sus siglas en inglés, proporcionan una estrategia rápida y sensible para la detección de diferentes patógenos (Feng *et al.*, 2001; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004; Jasson *et al.*, 2010).

La detección de *Salmonella* mediante técnicas moleculares se basa fundamentalmente en la detección del gen *invA*, específico para el

género *Salmonella* (Singer *et al.*, 2006). Este gen, codificado en el cromosoma bacteriano en una región conocida como isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1), se encuentra directamente relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal (Chacón *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar un método basado en la PCR para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) para su implementación en un laboratorio de microbiología de alimentos de la ciudad de Rosario, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de alimento

Para el desarrollo de esta metodología se empleó lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata), adquiridas en locales comerciales de la ciudad de Rosario, Argentina. Las hojas de lechuga fueron sometidas a un proceso de lavado-desinfección con solución acuosa de cloro para reducir la carga microbiana.

Bacterias utilizadas

Se utilizaron las cepas control de calidad *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, 50 aislamientos de *Salmonella* spp. de origen humano, animal y alimentario, y 30 cepas de microorganismos diferentes a *Salmonella* spp. de origen humano, animal y alimentario, provenientes de la colección de cepas perteneciente al grupo de investigación del Área Bacteriología, Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina). Se siguieron lineamientos de la AOAC International (2012).

Técnica de cultivo

A 225 mL de caldo lactosado (Oxoid,

Ltd., UK) se agregaron 25 g de lechuga y se incubó durante 24 h a 35 °C. Posteriormente, se subcultivó el caldo lactosado en caldos tetraciónato (caldo TT) y Rappaport-Vassilialis (RV) (Oxoid, Ltd., UK). Las muestras y controles se incubaron a 35 °C por 24 h, con posterior inoculación en agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y Hektoen (HK) (Oxoid, Ltd., UK). Las placas se incubaron por 24 h a 35 °C y se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). Las colonias sospechosas de *Salmonella* se analizaron por su perfil bioquímico empleando el kit API® 20E (bioMérieux, Francia).

Preparación de la muestra del alimento

La norma ISO 16140:2003 propone que los microorganismos inoculados artificialmente a un alimento deben encontrarse en condiciones similares a las que se encuentran naturalmente en el alimento. Por ello, se realizó la contaminación artificial del alimento con microorganismos estresados o dañados. El protocolo de stress sobre las células bacterianas consistió en la inoculación de 50 mL de caldo tripteína soya con 10^5 UFC/mL del cultivo bacteriano de 24 h de crecimiento. Estas suspensiones se incubaron durante 7 h a 37 °C y, posteriormente, el cultivo fue conservado durante 18 h a 4 °C. A continuación, las células bacterianas fueron sometidas a un tratamiento térmico a 55 °C durante 5 min. La viabilidad de las células bacterianas posterior a la lesión subletal, se determinó mediante evaluación del crecimiento bacteriano en agar *Salmonella-Shigella* y agar tripteína soya con el agregado de 6 g/L de extracto de levadura (ISO, 2003; Dodd *et al.*, 2007).

Contaminación del alimento

Se estudiaron 5 niveles de contaminación del alimento con el microorganismo estresado. Las concentraciones

finales en el caldo lactosado correspondieron a 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 UFC/mL de *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076. Se procesó un control negativo de muestra, un control negativo de reactivo, un control negativo y un control positivo.

Extracción de ADN bacteriano

Se efectuó la extracción del ADN bacteriano a partir del caldo lactosado y de los caldos RV y TT luego de que estos fueran incubados 24 h a 42 °C y 37 °C, respectivamente. Se colocó 1 mL de los caldos mencionados en tubos Eppendorf y se centrifugaron 5 min a 10000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de solución fisiológica. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100-200 µL de agua destilada estéril. Esta suspensión se calentó a 94 °C durante 15 min y se centrifugó 3 min a 13000 rpm. Se utilizó 2 µL del sobrenadante como templado para la reacción de PCR (Ridley, 1998).

Detección del gen *invA* mediante PCR

La detección del gen *invA* se realizó mediante PCR utilizando los cebadores específicos, *invA*-F: 5'-GCTGCGCGAACGGCGAAG-3' e *invA*-R: 5'-TCCCGGCAGAGTTCCCATT-3' (Ferretti *et al.*, 2001). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL en buffer Taq 1X; 2 mM de MgCl₂; 0,12 pM de cada cebador; 0,2 mM de cada dNTP y 0,5 U de Taq polimerasa. A esta mezcla de reacción se adicionó 2 µL del ADN bacteriano. El protocolo de amplificación consistió en 32 ciclos; 1 ciclo inicial 2 min a 94 °C, 30 ciclos 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C y el último ciclo 5 min a 72 °C empleando el termociclador MyCycler™ Thermal Cycler System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con

tinción de bromuro de etidio (0,5 µg/mL), durante 45 min a 140 mV. Las bandas se visualizaron con un transiluminador UV de doble intensidad DyNA Light (Labnet International, Inc., NJ, USA). El tamaño de la banda de amplificación correspondiente al gen *invA* (389 pb) se comparó con el marcador de peso molecular de 100 pb (Promega Corporation, WI, USA). Se utilizaron como control positivo ADN de la cepa *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y, como control negativo, ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Ensayo de inclusividad

Se analizaron 50 aislamientos de *Salmonella* spp. de origen humano ($n = 49$) y animal ($n = 1$). Se sembraron en agar XLD y agar Salmonella-Shigella. Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN, amplificación y revelado.

Ensayo de exclusividad

Se analizaron 30 aislamientos diferentes a *Salmonella* spp. de origen humano ($n = 22$), animal ($n = 4$) y alimentario ($n = 4$) (Cuadro 1). Se sembraron en agar Mueller-Hinton y agar Sangre, según los requerimientos nutricionales para su crecimiento. Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN, amplificación y revelado.

Límite de detección del método

Para establecer el límite de detección (LD) se ensayaron 10 concentraciones diferentes de ADN bacteriano mediante PCR (100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL; 0,75 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,125 µg/mL y 0,0625 µg/mL). Este estudio se realizó empleando la cepa *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076. Se cuantificó la concentración de ADN a 260 nm y a 280 nm utilizando espectrofotómetro marca UNICO®

(UNICO® NJ, USA) y se prepararon diluciones del mismo para su posterior amplificación y revelado.

Efecto de posibles inhibidores presentes en la muestra

La presencia de inhibidores de la PCR en la muestra a analizar fue evaluada empleando el caldo lactosado y los caldos RV y TT, a distintos niveles de concentración de *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076. Se procesaron controles negativos de muestra, de reactivo y un control negativo utilizando la cepa de *E. coli* ATCC 25922 y, finalmente, un control positivo empleando la cepa control de calidad de *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076.

Especificidad y sensibilidad relativa

Para determinar la especificidad y la sensibilidad relativa del método de PCR, se utilizaron los resultados obtenidos mediante el cultivo tradicional y la técnica de PCR al analizar las muestras inoculadas artificialmente con *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, los controles positivos y negativos.

Eficacia o concordancia

Se realizaron estudios de concordancia mediante la determinación del índice de concordancia Kappa (K) (Ochoa-Azze, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Salmonella ocupa un rol preponderante entre las bacterias que causan ETA. Por ello, es esencial una pronta y adecuada detección de esta bacteria en los alimentos. La mayoría de estos métodos se basan en técnicas tradicionales de cultivo que, aunque no demandan infraestructuras especialmente costosas, son métodos largos y laboriosos que retrasan el tiempo de obtención de resultados. En los

Cuadro 1.- Aislamientos utilizados para el ensayo de exclusividad.

Microorganismo	Origen
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Humano
<i>Aeromonas sobria</i>	Animal (aleta de
<i>Campylobacter coli</i>	Animal (pollo)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alimento (pollo)
<i>Candida albicans</i>	Humano
<i>Citrobacter freundii</i>	Humano
<i>Citrobacter koseri</i>	Humano
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Humano
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Humano
<i>Enterobacter cloacae</i>	Humano
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Humano
<i>Enterococcus faecalis</i>	Humano
<i>Escherichia coli</i>	Alimento (lechuga)
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	Alimento (queso)
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	Humano
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	Animal (cerdo)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	Animal (cerdo)
<i>Escherichia coli</i> shigatoxigénica	Alimento (queso)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Humano
<i>Proteus mirabilis</i>	Humano
<i>Proteus penneri</i>	Humano
<i>Proteus vulgaris</i>	Humano
<i>Providencia</i> spp.	Humano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano
<i>Serratia marscescens</i>	Humano
<i>Shigella flexneri</i>	Humano
<i>Shigella sonnei</i>	Humano
<i>Staphylococcus aureus</i>	Humano
<i>Vibrio</i> spp.	Humano
<i>Yersinia</i> spp.	Humano

últimos años los esfuerzos fueron destinados al desarrollo de métodos rápidos que reduzcan el tiempo de obtención de resultados con una adecuada validación frente al método de referencia (Jasson *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se analizó la detección de *Salmonella* spp. en lechuga (*L. sativa* L. var. *Capitata*) mediante la técnica de PCR y su comparación con el cultivo microbiológico, de acuerdo a lo requerido por

el Código Alimentario Argentino (CAA, 2017) en Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017, sobre las normas microbiológicas para *Salmonella* spp. y sus métodos de referencia.

La variedad de lechuga fue seleccionada porque es una planta de crecimiento anual que se consume durante todo el año y es frecuente encontrarla como ingrediente de ensaladas listas para el consumo.

Tanto para la extracción de ADN, como para el procesamiento de las muestras, la premisa fue utilizar métodos simples y económicos disponibles en los laboratorios de análisis de alimentos que utilizan PCR de manera de poder aplicar esta metodología como tamizaje para la detección del género *Salmonella* en lechuga pudiendo obtener un resultado en un plazo menor al de la técnica de referencia.

Ferretti *et al.* (2001) seleccionaron el gen *invA* para la detección del género *Salmonella* mediante PCR. Este gen codifica para una proteína bacteriana responsable de la invasión a la célula epitelial del huésped. Desde entonces, el gen *invA* fue adoptado como marcador genético del mencionado género bacteriano (Malorny *et al.*, 2003). Diferentes estudios emplearon la detección de este gen sobre colonias bacterianas y sobre distintas

matrices alimentarias (Lampel *et al.*, 2000; Malorny *et al.*, 2003; Nagappa *et al.*, 2007; Karmi, 2013).

En este trabajo, la determinación de la inclusividad de la PCR para la detección del gen *invA* sobre 50 aislamientos de *Salmonella* spp. evidenció una inclusividad de la mencionada técnica del 100 % (Cuadro 2). En la Fig. 1 se muestran las bandas de amplificación de 389 pb, correspondientes al gen *invA*, detectadas en los diversos aislamientos de *Salmonella* spp. ensayados. Estudios similares realizados por Rahn *et al.* (1992) han informado la detección del gen *invA* por PCR en 630 cepas de *Salmonella*, excepto de *S. litchfield* y *S. senftenberg*. Salehi *et al.* (2005), detectaron la presencia del gen *invA* por PCR al analizar 30 cepas de *Salmonella* recuperadas a partir de muestras de pollo.

En este estudio, al ensayar la exclusividad de la técnica, no se observó la presencia de bandas de amplificación en la totalidad de las cepas distintas al género *Salmonella* ensayadas (Fig. 2), estableciéndose una exclusividad del 100 % (Cuadro 2). Resultados similares fueron obtenidos por Rahn *et al.* (1992) al analizar 142 cepas de bacterias diferentes a *Salmonella* y por Salehi *et al.* (2005) al evaluar aislamientos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Cuadro 2.- Resultados de PCR para detección del gen *invA* obtenidos a partir de los ensayos de inclusividad y exclusividad.

Microorganismos	Resultado PCR	
	Presencia del gen <i>invA</i> (%)	Ausencia del gen <i>invA</i> (%)
<i>Salmonella</i> spp. (n = 50)	100	0
Cepas distintas al género <i>Salmonella</i> (n = 30)	0	100

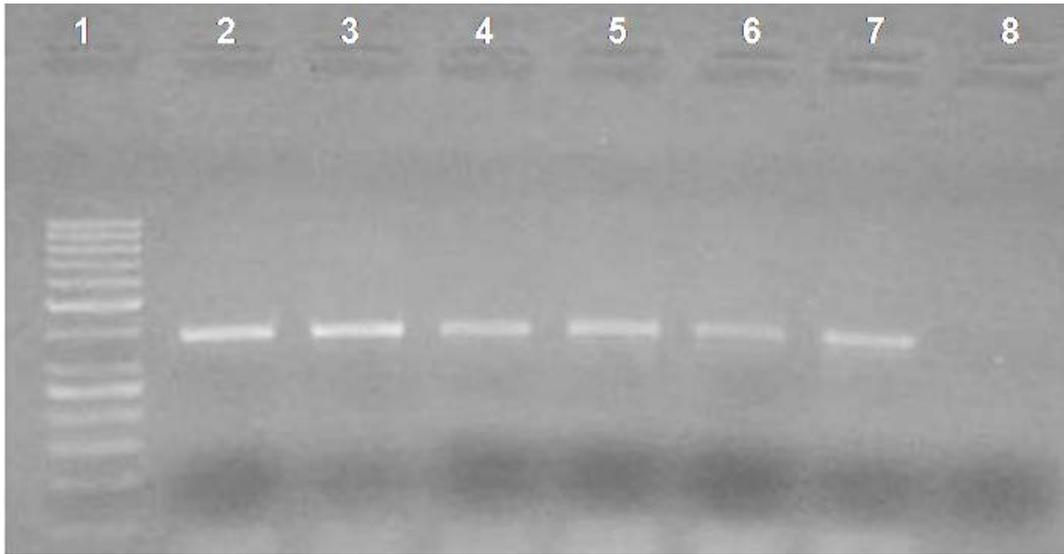


Figura 1.- Resultados obtenidos mediante la PCR para la detección del gen *invA* en aislamientos de *Salmonella* spp. Calle 1: marcador de peso molecular de 50 pb; calle 2-6: aislamientos identificados fenotípicamente como *Salmonella* spp.; calle 7: control positivo *Salmonella* Enteriditis ATCC 13076; calle 8: control negativo (sin templado de ADN).

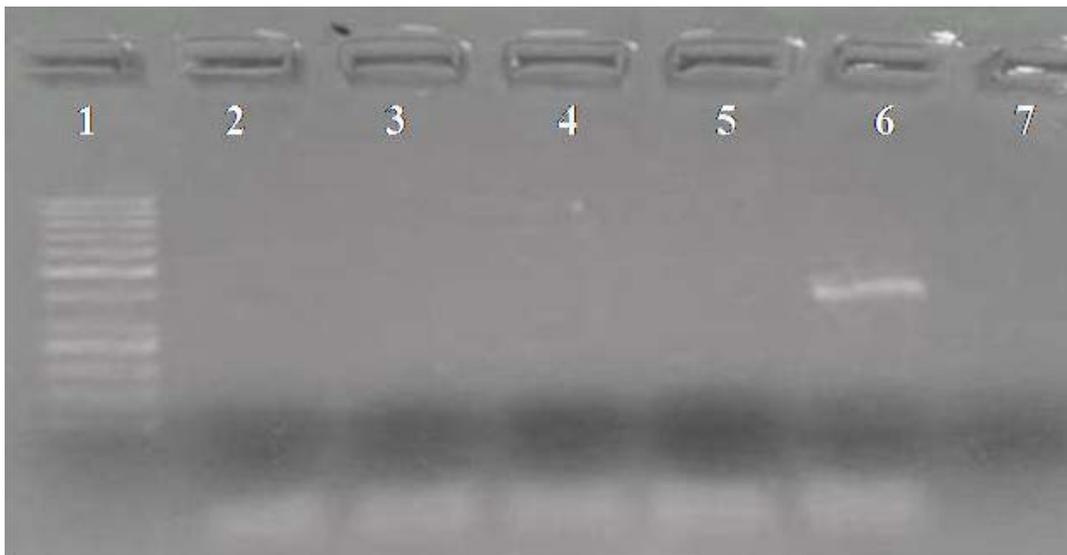


Figura 2.- Resultados obtenidos mediante la PCR para la detección del gen *invA* en aislamientos diferentes a *Salmonella* spp. Calle 1: marcador de peso molecular de 50 pb; calle 2: *Aeromonas hydrophyla*; calle 3: *Enterobacter agglomerans*; calle 4: *Shigella flexneri*; calle 5: *Escherichia coli* enteropatógena; calle 6: control positivo *Salmonella* Enteriditis ATCC 13076; calle 7: control negativo (sin templado de ADN).

En la Fig. 3 se observan los resultados obtenidos al analizar el límite de detección de la PCR en estudio. La banda de amplificación esperada de 389 pb se observó hasta una

concentración de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de ADN, fijándose esta concentración de ADN como la mínima concentración detectable mediante esta técnica (Cuadro 3).



Figura 3.- Resultado del límite de detección de la PCR para detección del gen *invA*. Calle 1: 100 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 2: 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 3: 10 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 4: 1 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 5: 0,75 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 6: 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 7: 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 8: 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 9: 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ de ADN; calle 10: control negativo (ADN *Escherichia coli*); calle 11: control positivo *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; calle 12: control negativo (sin templado); calle 13: marcador de peso molecular de 100 pb.

Diversos estudios determinaron la mínima concentración ADN detectada mediante PCR para detección del gen *invA* sobre diferentes matrices alimentarias. Pérez *et al.* (2008) demostraron la capacidad de detección mínima de 0,027 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de *Salmonella* en muestras de clara-yema de huevos. Por otra parte, Hernández *et al.* (2014) detectaron concentraciones de hasta 0,310 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN de *Salmonella typhimurium*.

Las técnicas microbiológicas son reconocidas como los métodos de referencia para la búsqueda de *Salmonella* (Malorny *et al.*,

2003). Por ello, se empleó esta metodología, recomendada por el CAA (2017), para el aislamiento de *Salmonella* spp. en vegetales para posteriormente realizar el análisis de la presencia inhibidores en la muestra y la comparación con los resultados obtenidos mediante la PCR evaluada en este estudio. Un problema que se repite en las muestras de alimentos es la presencia de inhibidores, donde el microorganismo objeto de estudio puede ser inhibido por la flora acompañante o la sensibilidad del ensayo de PCR puede resultar disminuida (Di Pinto *et al.*, 2007). La existencia

Cuadro 3.- Resultados obtenidos mediante PCR al analizar diferentes concentraciones de ADN de *Salmonella entérica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 para la determinación del límite de detección de la técnica.

Concentración ADN ($\mu\text{g/mL}$)	Gen <i>invA</i>
100	(+)
50	(+)
10	(+)
1	(+)
0,75	(-)
0,5	(-)
0,25	(-)
0,125	(-)
0,0625	(-)

(+): presencia de producto de amplificación de 389 pb correspondiente al gen *invA*.

(-): ausencia de producto de amplificación de 389 pb correspondiente al gen *invA*.

de inhibidores en muestras de alimentos, puede actuar a diferentes niveles durante el proceso de extracción y amplificación de los ácidos nucleicos y, eventualmente, conducir a la obtención de resultados falsos negativos (Rossen *et al.*, 1992; Alcázar-Montañez *et al.*, 2006). Al analizar el ADN proveniente de los caldos lactosado, TT y RV, se detectó el producto de amplificación de 389 pb correspondiente al gen *invA* en todas las muestras de lechugas inoculadas artificialmente con diluciones en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10^1 a 10^5 UFC/mL. No se observó un efecto inhibitor del alimento en estudio sobre la reacción de PCR (Fig. 4).

Se analizó la detección del género *Salmonella* en lechuga (*L. sativa* L. var. Capitata) por medio del cultivo convencional y la PCR. El método molecular permitió la

detección de *Salmonella* en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10^1 y 10^5 UFC/mL. Para todas las reacciones de amplificación el desempeño de los controles (control negativo de muestra, control negativo de reactivo, control negativo y control positivo) fue el esperado (Cuadro 4).

Por otra parte, se demostró un muy buen grado de concordancia entre el cultivo y la técnica de PCR, ya que el valor calculado del índice K fue de 1.

La PCR para detección del gen *invA*, marcador del género *Salmonella*, evaluada en este trabajo fue incorporada a un laboratorio de microbiología de alimentos de la ciudad de Rosario (Argentina) para realizar la evaluación de la sanidad de las hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) destinadas a consumo humano.



Figura 4.- Resultado de la amplificación del gen *invA* obtenido a partir del ADN extraído de las diluciones bacterianas en caldo lactosado. Calle 1: marcador 100 pb; calles 2-6: concentraciones 10^5 a 10^1 UFC/mL; calle 7: control positivo *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076; calle 8: control negativo muestra; calle 9: control negativo (ADN *E. coli* ATCC 25922); calle 10: control negativo de reactivo; calle 11: control positivo PCR (ADN *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076).

Cuadro 4.- Resultados obtenidos para el cultivo y la PCR para cada nivel de contaminación del alimento.

Nombre	Nivel de inoculación (UFC/mL)	Resultado	
		Cultivo	PCR (gen <i>invA</i>)
Nivel 1	10^1	+	De
Nivel 2	10^2	+	De
Nivel 3	10^3	+	De
Nivel 4	10^4	+	De
Nivel 5	10^5	+	De
CNM	0	-	ND
CNR	0	-	ND
CN	10^8	-	ND
CP	10^8	+	De

UFC: unidades formadoras de colonias. De: detectable. ND: no detectable. CNM: control negativo de muestra. CNR: control negativo de reactivo. CN: control negativo. CP: control positivo. (+): se obtuvo desarrollo de *Salmonella* spp. (-): no se obtuvo desarrollo de *Salmonella* spp.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron que la técnica molecular de PCR para la detección del gen *invA* es una alternativa valiosa para la detección de *Salmonella* spp. en hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) debido al elevado porcentaje de inclusividad y exclusividad de la mencionada técnica. El límite de detección fue de 1,0 µg/mL de ADN. Además, este trabajo evidenció que el método molecular y las técnicas microbiológicas convencionales (cultivo microbiológico) ensayadas presentaron un buen grado de concordancia.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Hospital Provincial de Rosario y a la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de Rosario) por proveer los aislamientos bacterianos utilizados en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcázar-Montañez, Claudia D.; Rubio-Lozano, Marñia Salud; Núñez-Espinosa, Fernando y Alonso-Morales, Rogelio A. 2006. Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. *Veterinaria México*. 37(4):417-429.
- AOAC International. 2012. AOAC International methods committee guidelines for validation of microbiological methods for food and environmental surfaces. AOAC® pre-publication draft - AOAC® Standards Development.
- Barrantes, Kenia y Achí, Rosario. 2011. Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 31(1):31-36.
- CAA. 2017. Código Alimentario Argentino. Capítulo 11, art. 925 cuatro.
- Caffer, M.I.; Terragno, Raquiel y Binsztein, Norma. 2008. Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas; A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Chacón, Luz; Barrantes, Kenia; García, Cristina y Achí, Rosario. 2010. Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 30(1):18-23.
- DB-INEI *et al.* 2012. Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI); Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB); A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”; Instituto Nacional de Alimentos (INAL-ANMAT); Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud de la Nación. Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Argentina, 2010-2012. En IV Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO- GFN). 30 mayo-02 junio. Buenos Aires, Argentina.
- Di Pinto, Angela; Forte, Vito Tony; Guastadisegni, Maria Corsignano; Martino, Carmela; Schena, Francesco Paolo and Tantillo, Giuseppina. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*. 18(1):76-80.
- Dodd, Christine E.R.; Richards, Philip J. and Aldsworth, Timothy G. 2007. Suicide through stress: a bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology*. 120(1-2):46-50.

- Eley, Adrian R. 1994. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S. A.
- Feng, Peter; Weagant, Stephen D. and Monday, Steven R. 2001. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(1):24-28.
- Ferretti, R.; Mannazzu, I.; Cocolin, L.; Comi, G. and Clementi, F. 2001. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2):977-978.
- Hernández, S.D.; Rosas, E.M.; Ramírez, G.M.E.; Aranda, I.M.E.; Miranda, J.L.; Leyva, R.G. y Pinto, R.R. 2014. Estandarización y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo. En Memoria de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Octubre 2014. Volumen 1 - Número 1, Resumen 130. Yucatán, México.
- ISO. 2003. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. ISO 16140:2003.
- Jasson, Vicky; Jacxsens, Liesbeth; Luning, Pieternel; Rajkovic, Andreja and Uyttendaele, Mieke. 2010. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiology*. 27(6):710-730.
- Karmi, Mohamed. 2013. Detection of virulence gene (*invA*) in *Salmonella* isolated from meat and poultry products. *International Journal of Genetics*. 3(2):7-12.
- Lampel, Keith A., Orlandi, Palmer A. and Kornegay, Leroy. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10):4539-4542.
- Li, Y. and Mustapha, A. 2004. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. *Food Microbiology*. 21(3):369-375.
- Malorny, Burkhard; Hoofar, Jeffrey; Bunge, Cornelia and Helmuth, Reiner. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1):290-296.
- Nagappa, K.; Tamuly, Shantanu; Brajmadhuri; Saxena, M.K. and Singh, S.P. 2007. Isolation of *Salmonella* Typhimurium from poultry eggs and meat of Tarai region of Uttaranchal. *Indian Journal of Biotechnology*. 6(3):407-409.
- Ochoa-Azze, C. Rolando Felipe. 2012. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. La Habana, Cuba: Finlay Ediciones. pp. 1-30.
- Parra, Miguel; Durango, Johnny y Máttar, Salim. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*. 7(2):187-200.
- Pérez, C.M.; Sánchez, M.M.; Henao, S. and Cardona-Castro, N.M. 2008. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en huevos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 40(3):235-242.
- Rahn, K.; De Grandis, S.A.; Clarke, R.C.; Curtiss, R. and Gyles, C.L. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cell Probes*. 6(4):271-279.
- Ridley, Anne M. 1998. Genomic fingerprinting by application of rep-PCR. In *Molecular bacteriology: protocols and clinical*

- applications. (pp. 103-115). New Jersey, USA: Humana Press, Inc.
- Rodríguez-Sánchez, Iram Pablo y Barrera-Saldaña, Hugo A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UNAL*. VII(3):323-335.
- Rossen, Lone; Nørskov, Pernille; Holmstrøm, Kim and Rasmussen, Ole F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbiological diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 17(1):37-45.
- Salehi, T. Zahraei; Mahzounieh, M. and Saeedzadeh, A. 2005. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *International Journal of Poultry Science*. 4(8):557-559.
- Singer, Randall S.; Cooke, Cara L.; Maddox, Carol W.; Isaacson, Richard E. and Wallace, Richard L. 2006. Use of pooled samples for the detection of *Salmonella* in faeces by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 18(4):319-325.