

Implementación de biosensores de flujo lateral y PCR para la detección del *Listeria monocytogenes* en procesos de producción de alimentos

Alcalá Rosas, R. I., Figueroa López, A.M., Cantú Soto, E. U., Ruiz Vega D. A.

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur, colonia centro, 85000, Cajeme, Sonora.
alejandro.figueroa@itson.edu.mx

Palabras clave: NALF, Carne, Patógeno

Introducción

Una de las mayores inquietudes de la salud pública, es la seguridad alimentaria, debido a que tiene un efecto directo sobre la vida y salud de los seres humanos. Las cuestiones de higiene, almacenamiento inadecuado, malas prácticas de manipulación de alimentos, así como los suministros contaminados generan problemas asociados a la seguridad alimentaria y esto origina enfermedades transmitidas por los alimentos. La seguridad alimentaria durante la fabricación y el procesamiento de alimentos es una preocupación vital. Los patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos más importantes asociados con la carne son *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes*, es una bacteria transmitida por alimentos Gram positiva que pertenece al género *Listeria* junto con *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y contiene 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, and 7); *L. monocytogenes* causa listeriosis en humanos mientras que *L. ivanovii* infecta principalmente a rumiantes [1].

En México, no hay registros de que la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* cause enfermedad en humanos. Un estudio en México reporta una prevalencia de *L. monocytogenes* en muestras de carne mexicana y carne importada de 18% y 8.8%, respectivamente [2]. En Sonora, se estudió la prevalencia de *L. monocytogenes* en rastros productores de carne de cerdo, se encontró una prevalencia del 15.9 % en muestras de lomo de cerdo y un 20.8% para superficies inertes que están en contacto durante el procesamiento de la carne [1].

Los métodos de microbiología convencional son los estándares de oro para la detección de *L. monocytogenes*. Estos métodos son tardados y complicados, por lo general requieren de mucho trabajo debido a los pasos que se realizan para la detección, incluidos los enriquecimientos selectivos y diferenciales [3]. La regulación en México acorde a la NOM-210-SSA1-2014 (apéndice C) propone las directrices para establecer en muestras de carne solamente la presencia de *L. monocytogenes*, sin embargo, esta metodología no es específica al 100 %. Este procedimiento presenta inconveniente al sector productor en Sonora, al no poder tener una herramienta que haga más eficiente y rápido para tener resultados fidedignos y no causar retrasos en sus productos y reducir así los posibles riesgos de contaminación y brotes.

Los métodos de biología molecular como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés) presenta una excelente precisión y especificidad para la detección de *L. monocytogenes* [4]. Estudios recientes, han aplicado los biosensores como una alternativa para hacer más eficiente la detección e identificación de patógenos alimentarios *in situ*. Recientemente se ha aplicado con una técnica sencilla llamada flujo lateral de ácido nucleico (NALF), la cual ha atraído considerable atención debido a sus características rápidas y portátiles [3]. La estrategia de NALF se basa en el etiquetado de uno de los oligonucleótidos marcados con biotina para poder realizar una lectura visual de los productos basado en la reacción de unión entre la biotina y la estreptavidina acopladas a nano-partículas de oro, mientras que el otro oligonucleótido se etiqueta con fluoresceína (FLU) o dioxigenina (DIG) para ser capturado posiciones diferentes en la misma tira con anticuerpos específicos antiFLU o antiDIG, pudiendo detectar hasta dos amplificaciones en una misma tira NALF [5]. Este tipo de biosensor ha sido aplicado en el diagnóstico

clínico, monitoreo ambiental y en el análisis de patógenos en alimentos [6]. Si se realiza el acoplamiento de la reacción en cadena de la polimerasa (Palm-PCR) en conjunto con el biosensor NALF podremos resolver deficiencias en el tiempo de detección, la reciente creación de la técnica de PCR rápida (aprox. 18 min) permite reducir el tiempo de la reacción mientras que el biosensor NALF detecta las amplificaciones positivas para los patógenos y en pocos minutos se podrá analizar *L. monocytogenes* a simple vista a través de la reacción de hibridación de ácido nucleico y sondas colorimétricas [7]. Esta propuesta se enfoca en estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa rápida acoplada al ensayo de flujo lateral de ácidos nucleicos para la identificación de *Listeria monocytogenes* obtenida de un proceso de producción de carne de cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa control y condiciones de crecimiento.

En este estudio se utilizó la cepa control *Listeria monocytogenes* ATCC7644, la cual se reactivó en tripticasa de soya y se incubó a 37°C por 18 - 24 horas. La extracción de ADN se realizó a partir de un cultivo en caldo tomando como inóculo la placa crecida anteriormente, después de 18 horas a 37°C.

Preparación de ADN genómico.

Para la extracción del ADN genómico de las bacterias se utilizó el kit comercial DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen Cat-569504), específicamente en la sección para Gram positivas siguiéndose las indicaciones del proveedor. Posteriormente el ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su análisis por PCR. La concentración y calidad del ADN se determinó en un equipo Nanodrop 2000c, y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y el resultado será documentado utilizando un fotodocumentador DNR MiniBis pro. El número de copias de ADN genómico se calculó para 0.5 ng de ADN basado en el peso molecular del ADN cromosómico de doble cadena, siendo aproximadamente 1.5×10^5 copias de ADN cromosomal de *Listeria monocytogenes*.

Diseño de oligonucleótidos y PCR

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se describen a continuación. Se usaron como blanco un gen específico que codifica para la listeriolisina O (*HlyA*) de *L. monocytogenes*. Cada oligonucleótido se marcó con diferentes etiquetas para realizar la detección posterior al PCR en el ensayo NALF1. Flanqueando el gen se diseñó un oligonucleótido forward (LmA) marcado fluoresceína 5'-/56-FAM/CGG AGG TCC CGC AAA GAT G-3' y el oligonucleótido reverso se diseñó con una etiqueta de biotina 5'-/5Biosg/CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT -3'.

La mezcla de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que con 1X de Buffer PalmTaq HS (suplementado con MgCl₂ 1.5 mM), dNTP 0.2mM, ADN polimerasa de alta velocidad PalmTaq 0.4 U (Ahram Bio-systems, Seúl, Corea), oligonucleótidos 10 µM de cada uno y 0.5 ng de ADN. La PCR se llevó a cabo en un termociclador PALM PCR en modo T1 (G2-12, Ahram Biosystems); la temperatura de anillamiento fue de 56°C, por 20 ciclos (14 minutos). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Los productos de PCR se analizaron siguiendo dos estrategias para asegurar su funcionamiento y especificidad. Primeramente, se evaluó los productos siguiendo la metodología tradicional con un gel de agarosa al 1.5% en 0.5X de buffer trisacetato-EDTA teñido con bromuro de etidio y con condiciones de corrida de 45 minutos a 90 V y los productos fueron visualizados en un fotodocumentador DNR MiniBis pro. Posteriormente para la detección de *L. monocytogenes* se utilizó el sistema NALF de línea única (NALF1), se tomó 2 µL del producto de PCR diluido con 100 µL de buffer NALF. El producto de PCR diluido se adicionó al reservorio de la cinta NALF y se esperó hasta que el flujo lateral recorra al sistema completo. Se visualizó el resultado positivo para *L. monocytogenes* cuando los anticuerpos diseñados para la fluoresceína hayan atrapado al extremo del oligonucleótido en la posición "T" de la reacción de unión en la tira NALF, mientras que el extremo de la biotina en conjunto con la estreptavidina y las nanopartículas de oro marcarán las líneas de prueba "C". Los ensayos fueron documentados mediante fotografía.

Ensayo de detección mínima

Se usó una concentración conocida de ADN, basado en el número de copias contenidas en 1ng de ADN, siendo 3×10^5 copias del ADN genómico de doble cadena. Se realizaron diluciones seriadas para disminuir la concentración desde 3×10^6 hasta 3×10^0 . Posteriormente se realizó cPCR y ensayo NALF.

Resultados y discusión

Detección específica y sensibilidad de *Listeria monocytogenes* usando cPCR y ensayos NALF1

La biología molecular actualmente está siendo de vital importancia para la detección específica de patógenos en la industria alimentaria. La detección de patógenos en el sitio del proceso aún no es factible, se pretende poder implementar este procedimiento enfocado en disminuir el tiempo del análisis. El uso de cPCR es una herramienta con gran potencial para poder usarse en los sitios donde se desea hacer la detección debido a su versatilidad y naturaleza portátil ya que no requiere de electricidad para funcionar [8]. Aunque la técnica fue desarrollada en el 2011, actualmente no se han encontrado reportes sobre aplicación de esta para detectar *Listeria monocytogenes*, siendo posiblemente este el primer reporte.

La detección específica de *Listeria monocytogenes* radica en la amplificación del gen HlyA que aparece en las cepas patógenas, principalmente asociado a cepas que han causado infección en humanos [1]. Se obtuvo una amplificación usando ADN genómico de *Listeria monocytogenes* como templado, y como se esperaba debido a la especificidad del gen no se logró detectar amplificación en cuando se utilizó ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp (Figura 1A).

Se tomaron alícuotas del PCR anterior y se evaluaron en las tiras NALF1. Los resultados fueron similares, se puede observar que se obtuvo una línea de color rojo solo con el amplicón (sitio "T") proveniente de la muestra realizada con ADN genómico de *Listeria monocytogenes*, resultando en una detección positiva (Figura 1B). No mostraron coloración las alícuotas pertenecientes a las muestras de ADN de los otros patógenos (Figura 1B).

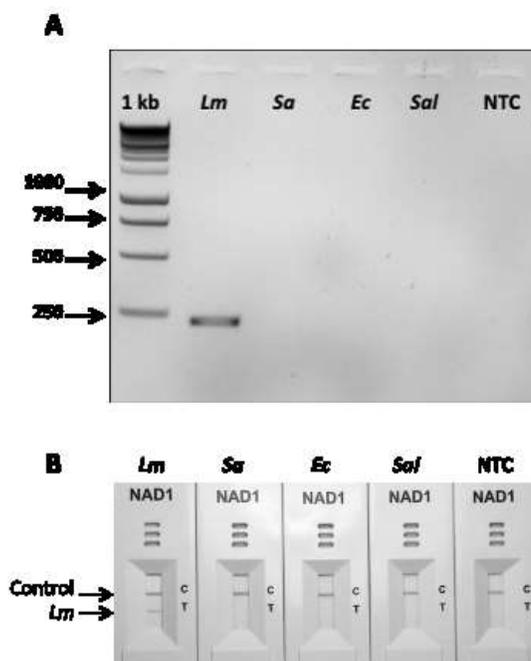


Figura 1. Detección específica de *Listeria monocytogenes* usando cPCR y ensayos NALF1. A) Gel de electroforesis en gel de agarosa de cPCR y su especificidad para *Lm*, operación del cPCR fue por 18 min a 30 ciclos. Se utilizó como templado ADN genómico de *Listeria monocytogenes* (*Lm*), *Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Escherichia coli* (*Ec*), *Salmonella* sp (*Sal*) y agua como control negativo (NTC). B) Ensayos NALF de los productos de cPCR. NTC, control sin templado.

El funcionamiento del ensayo NALF depende de la amplificación de cPCR ya sea específica o inespecífica. Las tiras NALF para su correcto funcionamiento requieren de un diseño adecuado de los primers, ya que si hay una amplificación inespecífica en la reacción puede resultar en un falso positivo dando una coloración en la tira.

El acoplamiento de estas dos técnicas tiene una ventaja en tiempo en cuanto al procedimiento de detección. Estudios previos demuestran que patógenos como *Salmonella* y *E. coli* pueden ser detectados en un tiempo aproximado de 20 minutos partiendo de muestras de ADN previamente purificados [7]. En este trabajo de igual forma se logró detectar a *Listeria monocytogenes* partiendo de muestras de ADN previamente purificadas.

Al momento, se ha logrado detectar de forma específica a *L. monocytogenes*. Un punto importante para considerar es el límite mínimo de detección. Se obtuvo un amplicón al usar 3×10^6 y 3×10^5 copias del genoma, en la tira NALF se observa una línea de color rojo en las mismas concentraciones respectivamente, siendo más tenue la de menor concentración.

Aquí se logró detectar hasta 3×10^5 copias de ADN genómico. Al momento no existe reportes sobre el uso de esta técnica con este patógeno. Para *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli* se reportan valores 3×10^2 tanto en la cPCR en gel de agarosa y las tiras NALF [7].



Figura 2. Gel de agarosa en comparación con las tiras NALF1. A, Reacciones de cPCR con ADN templado de *Listeria monocytogenes*. Pb, pares de bases. B, ensayos NALF de alícuotas de cPCR. NTC, control sin templado.

Conclusión

Se logró detectar de forma específica a *Listeria monocytogenes*. El límite mínimo de detección son 3×10^5 copias del ADN genómico, es necesario continuar realizando estudios para bajar el límite mínimo. La unión

de estas dos técnicas puede bajar considerablemente los tiempos de análisis para la detección en sitio de los patógenos alimentarios dando un total de 60 minutos entre la extracción de ADN y el resultado final.

Agradecimientos

Los autores agradecen a PROFAPI ITSON (folio 2020-0607) por el financiamiento y a la empresa BIOERA México S.A. de C.V., distribuidor exclusivo en México de Ahram Biosystems por el apoyo brindado para el desarrollo del proyecto.

Bibliografía

- [1] Figueroa-López A.M., Maldonado-Mendoza I.E., López-Cervantes J., Verdugo-Fuentes A.A., Ruiz-Vega D.A., Cantú-Soto E.U. (2019). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert surfaces. *Brazilian J. Microbiol.* **50**: 817–824.
- [2] Rubio Lozano M.S., Martínez Bruno J.F., Hernández Castro R., Bonilla Contreras C., Méndez Medina R.D., Núñez Espinosa J.F., Echeverry A., Brashears M.M. (2013). Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Rev. Mex. ciencias Pecu.* **4**: 107–115.
- [3] Li F., Li F., Luo D., Lai W., Xiong Y., Xu H. (2018). Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes*. *Anal Chim Acta* **1017**: 48–56.
- [4] Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science (80-)* **252**: 1643–1651.
- [5] Ben Aissa A., Jara J.J., Sebastián R.M., Vallribera A., Campoy S., Pividori M.I. (2017). Comparing nucleic acid lateral flow and electrochemical genosensing for the simultaneous detection of foodborne pathogens. *Biosens. Bioelectron.* **88**: 265–272.
- [6] Deng H., Liu Q., Wang X., Huang R., Liu H., Lin Q., Zhou X., Xing D. (2017). Quantum dots-labeled strip biosensor for rapid and sensitive detection of microRNA based on target-recycled nonenzymatic amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **87**: 931–940.
- [7] Kim T.H., Hwang H.J., Kim J.H. (2019). Ultra-fast on-site molecular detection of foodborne pathogens using a combination of convection polymerase chain reaction and nucleic acid lateral flow immunoassay. *Foodborne Pathog. Dis.* **16**: 144–151.
- [8] Kim T.-H., Hwang H.J., Kim J.H. (2019). Optimization of ultra-fast convection polymerase chain reaction conditions for pathogen detection with nucleic acid lateral flow immunoassay. *Int. J. Oral. Biol.* **44**: 8–13.