

DetECCIÓN MOLECULAR ULTRA RÁPIDA DE *E. coli* O157:H7 EN CARNE DE CERDO MEDIANTE UNA COMBINACIÓN DE cPCR E INMUNOENSAYO (NALF)

López Cruz O.E.^{1,2}, Cantú Soto E.U.¹, Campas Baypoli O.N.¹, Chávez-Almanza A.F.¹, Anduro Jordan J.A.¹, Álvarez González J.M.¹

¹Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias.

²Maestría en Ciencias en Recursos Naturales.

Calle 5 de febrero 818 sur Col. Centro, Cd. Obregón, C.P. 85000, Sonora, México. Tel. +52(644) 4100900.

Correo: ernesto.cantu@itson.edu.mx

Palabras clave: *E. coli* O157:H7, cPCR, cerdo

Introducción.

El serotipo STEC O157:H7 se ha reconocido como parte del grupo de patógenos emergentes más importantes en la industria alimentaria. Una de sus características más relevantes es sin duda su baja dosis infectante, la cual se estima va de 10 a 100 células (Nguyen and Sperandio, 2012). Su principal factor de virulencia es la producción de dos potentes toxinas denominadas toxina Shiga producidas por los genes *stx1* y *stx2*; entre los principales padecimientos a los que se le ha asociado incluye diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Bhunia, 2018).

Para la identificación del serotipo O157:H7 la US-FDA establece el uso de la qPCR como método oficial (Bacteriological Analytical Manual, capítulo 4), pero la técnica sigue siendo costosa y compleja para usarse como método de rutina en el proceso de producción de alimentos en México. En ese sentido la PCR por convección (cPCR) la cual es una PCR de punto final, es una opción viable y de bajo costo debido a su especificidad y sensibilidad.

El sistema agroalimentario mexicano es de los más completos y organizados del mundo; específicamente, el país es un importante productor de porcino en canal. Durante el año 2019 se produjeron 1,066,451 toneladas siendo Jalisco el productor número 1 con 232,296 toneladas; Sonora es el segundo productor nacional, con un volumen de 206,982 toneladas para el mismo año (SIAP, 2019). Aun con la alta relevancia que esta industria cárnica representa para el mercado nacional e internacional, tiene serias deficiencias respecto al monitoreo de patógenos emergentes, como es el caso de *E. coli* O157:H7. En la actualidad los planes de muestreo del patógeno en rastros TIF son reducidos y en algunos casos toman decisiones en retrospectiva, esto es derivado de la logística necesaria para el desarrollo de los análisis donde incluso puede ser fuera de la entidad donde está ubicado el rastro TIF, y donde el resultado es entregado varios días después (Comunicación Personal, 2019).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue estandarizar un método ultra rápido e in situ para la detección molecular de *E. coli* O157:H7 en carne de cerdo utilizando una combinación de cPCR e inmunoensayo de flujo lateral de ácidos nucleicos.

Metodología.

Cepa Control. La cepa *E. coli* O157:H7 H28-1 fue utilizada como control positivo del estudio; fue aislada de heces de bovinos, reportada por Rivas-Ruiz y cols., (2020); como control negativo se empleó *Salmonella enterica* (ATCC 14028). Para la cinética microbiana de H28-1, la cepa criopreservada (-80 °C) fue resembrada en agar tripticasa de soya (ATS) mediante estría por agotamiento e incubada a 37 °C durante 24 h. A partir de una colonia (2 mm) se inoculó un tubo con 10 mL de caldo tripticasa de soya (CTS) incubado en baño con agitación a 37 °C por 6 h; posteriormente 0.1 mL del cultivo fue añadido a un frasco con 100 mL de CTS, el cual se incubó a 37 °C en baño con agitación por 6 h, periodo durante el cual se monitoreó la densidad óptica

(600 nm) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) en periodos de 1 hora hasta el final de la fase exponencial. Todas las lecturas se realizaron por duplicado.

Así mismo, se realizó conteo de UFC/mL en cada punto de la fase exponencial utilizando la metodología propuesta por Herigstad *et al.*, (2001); brevemente, 100 μ L del cultivo se diluyeron en 900 μ L de agua destilada estéril para obtener diluciones seriadas hasta 10^{-6} . De cada dilución un duplicado de 50 μ L fueron inoculados (5 gotas) en placas con ATS seccionadas e incubadas a 37 °C por 24 h.

Preparación del ADN genómico. El material genético fue extraído de H28-1 y *Salmonella* entérica (ATCC 14028) utilizando el DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) acorde a las instrucciones del fabricante, protocolo para Gram-negativas. La concentración y pureza del ADN fue establecidos utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c y la integridad mediante gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.33 mg/mL).

Oligonucleótidos utilizados y diseño de la PCR. La cPCR se desarrolló en 20 μ L de volumen de reacción, conteniendo 1X PalmTaq HS buffer (suplementada con 1.5 nM de $MgCl_2$), 0.2 mM dNTPs, 0.4 U PalmTaq high-speed DNA polymerase (Ahrm Biosystems, Seoul, Korea) y 10 μ M de cada oligonucleótido. Para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 se utilizó el inmunoensayo NALF2 (Nucleic Acid Lateral Flow) doble línea (Ahrm Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados en el estudio se enlistan en la tabla 1 (Kim *et al.*, 2018). Se utilizó 1 μ L de ADN genómico como templado. La cPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador portátil operado por batería y de convección térmica PALM PCR (modelo G2-12, Ahrm Biosystem). La velocidad utilizada fue turbo 1 (T1), y la temperatura de anillamiento fue de 56°C. Las reacciones de PCR incluyeron 30 ciclos (21 minutos). El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo PALM PCR.

Nombre	Secuencia 5'-3''	Ta (°C)	Amplicón (pb)	Especie / antígeno
O157-DIG	Forward: Biotin-GGATGACAAATATCTGCGCTGC	56.6	213	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 / O157
	Reverse: Digoxigenin-GGTGATTCCCTTAATTCCTCTCTTTCC	55.3		
H7-FAM	Forward: Biotin-GCGCGAAGTTAAACACCACG	57.3	108	<i>Escherichia coli</i> O157 / H7
	Reverse: FAM-CGGTGACTTTATCGCCATTCC	56.1		

Preparación de carne (lomo de cerdo) artificialmente contaminada. La carne de cerdo (lomo) fue adquirida en el mercado local. Para el ensayo, 1 g de carne fue inoculado con 0.1 mL de diferentes cantidades de células viables de la cepa H28-1 (2.45×10^5 – 2.45×10^0 UFC/mL). La carne (1 g) fue diluida con 9 mL de buffer de fosfato (butterfield) e incubada a 37 °C por 6 horas en baño con agitación. Posterior a la incubación, se obtuvo ADN genómico a partir de 1 mL de cada muestra, cómo se describió previamente. 1 μ L del eluido fue utilizado como templado (10-100 ng/ μ L) y se realizó la cPCR como se describió anteriormente. Los amplicones O157 y H7 se detectaron utilizando el inmunoensayo NALF2 y gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. El experimento se realizó por triplicado.

Aislamiento e identificación de *E. coli* O157:H7 a partir de muestras de carne de cerdo (lomo). 19 muestras de carne fueron colectadas en 4 ciudades de Sonora, México (Hermosillo, Guaymas, Cd. Obregón y Navjoa). El aislamiento de cepas STEC sospechosas se realizó de acuerdo al US-FDA Bacteriological Analytical Manual (Capítulo 4A); se enriquecieron 25 g de muestra en 225 mL de buffer de fosfatos (Butterfield), incubado a 37 °C por 24 h, seguido de diluciones seriadas (hasta 10^{-4}) y sembrando 50 μ L de las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} en placas de agar Rainbow® O157 (Biolog) y MacConkey sorbitol con telurito de

potasio (1%) y cefixime (0.05 mg/L) mediante siembra por superficie. Las colonias típicas a STEC a partir del agar Rainbow® O157 (negras, purpuras-azul o grises) o MacConkey sorbitol (incoloras o gris neutro) fueron inoculadas en CTS, y crio preservadas en glicerol al 20% a -80°C hasta su análisis.

Resultados y discusión.

La cPCR fue estandarizada con los oligonucleótidos específicos (tabla 1) para la detección de *E. coli* O157:H7, los cuales amplifican regiones específicas de los genes *rfbE* y *flhC* que codifican para los antígenos O y H respectivamente (Fields *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1999).

En la figura 1 se observan los productos obtenidos por cPCR correspondientes a los antígenos somático O (213 pb) y flagelar H (108 pb) respectivamente; no fueron obtenidos productos con ADNg de *Salmonella enterica* (ATCC 14028); los mismos resultados se observan en los inmunoensayos NALF2.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad del método en carne de cerdo (lomo) se muestran en la figura 2; se probaron 6 niveles que fueron desde 2.45×10^5 hasta 2.45×10^0 UFC/g siendo factible la amplificación hasta el nivel más bajo (245 cel/g) lo cual demuestra la especificidad y sensibilidad del método. Estos resultados son congruentes con los reportados por Kim *et al.*, (2018), donde utilizaron leche fresca y obtuvieron una sensibilidad del método de hasta 4.5×10^0 cel/mL.

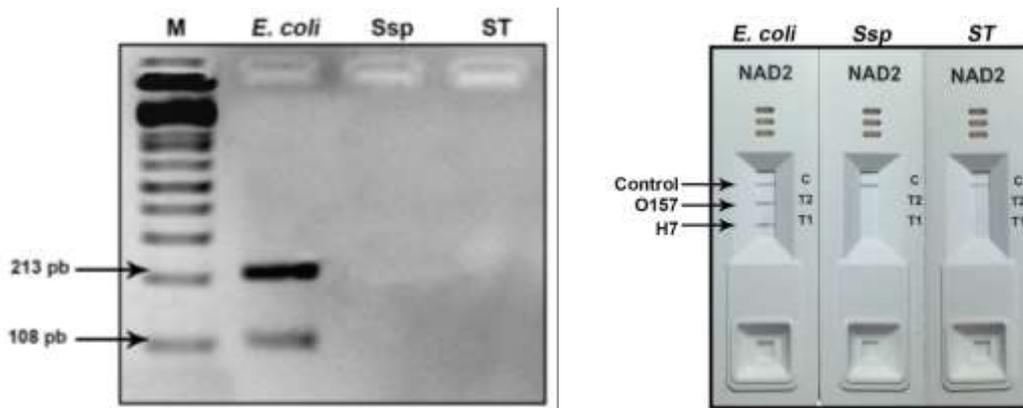


Figura 1. Detección específica de *E. coli* O157:H7 empleando cPCR e inmunoensayo NALF2. La cPCR multiplex fue estandarizada utilizando ADNg de *E. coli* O157:H7 (cepa H28-1) con los oligonucleótidos O157-DIG y H7-FAM. *Salmonella entérica* fue utilizada como control negativo. M, marcador de peso molecular; Ssp, *Salmonella entérica* (ATCC 14028); ST, sin templado.

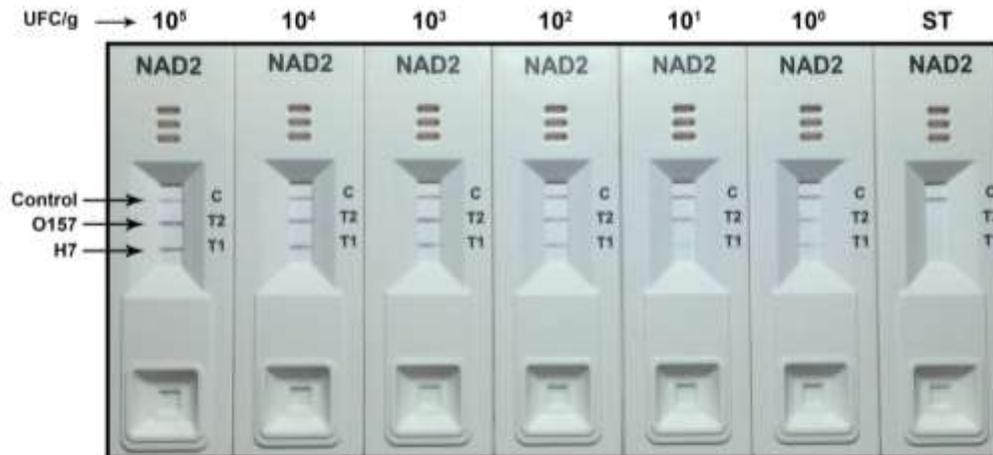


Figura 2. Detección de *E. coli* O157:H7 en carne contaminada artificialmente, con 6h de pre enriquecimiento. La carne se contaminó con $2.45 \times 10^5 - 2.45 \times 10^0$ UFC/g de *E. coli* O157:H7 (H28-1).

Se encontró presencia de *E. coli* O157:H7 en 7 muestras de carne de cerdo (lomo) expedida en puntos de venta de cuatro ciudades del Sonora, México cuando se utilizó agar cromogénico Rainbow® y MacConkey sorbitol con telurito de potasio (1%) y cefixime (0.05 mg/L) para el aislamiento selectivo. Es importante mencionar que los puntos de venta no necesariamente correspondieron a sitios que expenden carne calidad TIF lo que puede explicar la alta incidencia del patógeno en las muestras (36.8%), siendo este el primer reporte de su tipo en esta región del país.

Conclusiones.

La cPCR y el inmunoensayo de flujo lateral para ácidos nucleicos es un método específico y sensible para la detección de *E. coli* O15:H7 en carne de cerdo, que puede ser de fácil implementación por el área de calidad de los rastros TIF en México, permitiendo mejorar el monitoreo del proceso, ajustando así sus planes de muestreo y con ello la toma de decisiones.

Agradecimientos.

Los autores agradecen a PROFAPI ITSON (folio 2020-0536) 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.

Referencias.

1. Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(July), 90.
2. Bhunia, A. K. (2018). Foodborne Microbial Pathogens. En *Foodborne Microbial Pathogens*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4>.
3. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019). http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecConcentrado.jsp. Acceso: 08 de octubre de 2020.

4. Rivas-Ruiz CM, Cantú-Soto EU, Maldonado-Mendoza IE, Figueroa-López AM, Anduro-Jordan JA, Luna-Nevarez P, López-Castro PA. (2020) Detección de *Escherichia coli* productora de toxina-Shiga en bovinos asintomáticos del sur de Sonora, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7(2): e2240. DOI:10.19136/era.a7n2.2240.
5. Herigstad, B., Hamilton, M., and Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. 44:121-129.
6. Tae-Hoon Kim, Hyun Jin Hwang, and Jeong Hee Kim. 2018. Ultra-Fast On-Site Molecular Detection of Foodborne Pathogens Using a Combination of Convection Polymerase Chain Reaction and Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *Foodborne pathogens and disease*. 16 (2). DOI: 10.1089/fpd.2018.2500.
7. Patricia I. Fields, Kristina Blom, H. Jeanette Hughes, Leta O. Helsel, Peter Feng, and Bala Swaminathan. 1996. *Journal of Clinical Microbiology*. 33 (5): 1066-1070.
8. John J. Maurer, Denise Schmidt, Patricia Petrosko, Susan Sanchez, Lance Bolton, and Margie D. Lee. 1999. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (7): 2954-2960.