

COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN QUESOS

Toledo-Flores, L.J.¹, Bernabé-Pérez, E. A.², Martínez-Martínez, L.² y Marcos-Viquez J.A.³, Franco-Gallardo J.O.³

¹Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Oaxaca. Ave. V. Bravo Ahuja 125, Oaxaca de Juárez, Oax., C.P. 68030, México. ²Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Calz. San Felipe del Agua No. 108, C.P. 68120, México.

³Laboratorio OpenLab. Cerro del Agua 274, Copilco Universidad, Coyoacán, 04360 Ciudad de México, CDMX.

Correo: luis.toledo@itoaxaca.edu.mx.

PALABRAS CLAVE: Aislamiento, amplificación, ácido nucleico, microorganismos

Introducción

La inocuidad de los alimentos es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores. Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza microbiológica, química o física. Se sabe que alrededor de 40 diferentes patógenos de origen alimentario causan enfermedades humanas. Más del 90% de los casos confirmados y las muertes causadas por dichos patógenos han sido atribuidos a bacterias. Entre las bacterias más comunes se encuentran *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus* y *Campylobacter jejuni*. No obstante, aproximadamente el 98% de los microorganismos encontrados en los productos alimenticios no son patógenos. Por esta razón, se requiere desarrollar pruebas de diagnóstico que puedan detectar específicamente los microorganismos de interés. Tradicionalmente, la identificación de microorganismos en laboratorio se ha llevado a cabo de manera rutinaria mediante el aislamiento del microorganismo problema y la observación de sus características fenotípicas expresadas, como su morfología, comportamiento bioquímico y metabolismo [1]. Sin embargo, esta metodología presenta varias limitaciones, por ejemplo, el tiempo para obtener resultados o la dificultad que presentan algunos microorganismos para ser cultivados, como es el caso de los microorganismos extremófilos o las bacterias denominadas viables no cultivables.

La constante actualización de los métodos moleculares y de análisis génico conlleva la necesidad de desarrollar métodos de extracción de ADN que sean simples, eficientes y de bajo costo. La identificación de microorganismos a través de técnicas moleculares es actualmente la más utilizada gracias a su precisión. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de diagnóstico molecular sumamente valorada por su rapidez de resultados, alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, el desempeño de la PCR depende fundamentalmente de la calidad de la muestra a analizar, es decir del ADN, el cual, debe ser de alta calidad y pureza. Por esta razón, son necesarias técnicas especializadas y estandarizadas para su extracción. Existe una cantidad considerable de metodologías de extracción de ADN bacteriano, algunas de ellas utilizan altas concentraciones de sales para la lisis celular, resinas quelantes que no requieren una digestión previa con enzimas como la proteinasa K y la metodología fenol-cloroformo o extracción con solventes orgánicos que se fundamenta en la lisis celular y la eliminación de restos proteicos y lipídicos presentes junto con los solventes. Esta diversidad permite seleccionar la técnica que mejor se ajuste a las necesidades de cada investigador teniendo en cuenta varios factores, como la matriz de la muestra, material con que se cuenta para realizar la extracción y la cantidad de ADN requerida para los estudios.

El objetivo de esta investigación fue evaluar tres métodos de extracción de ADN de cultivos de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* y *L. monocytogenes* con respecto al rendimiento, pureza y calidad del producto. Los métodos fueron: tratamiento térmico, método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y un kit comercial que digiere el ARN y separa las proteínas por precipitación con sales (Wizard Genomic DNA Purification Kit).

Metodología

Cultivos bacterianos

La detección de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* y *L. monocitogenes* se realizó en muestras de 25 g de queso artesanal de Oaxaca, las cuales se homogeneizaron 1:10 en caldo lactosado y se incubaron durante 24h a 35°C. Posteriormente, se realizaron las pruebas presuntivas y confirmativas, de acuerdo al método normativo aprobado por la SSA para la identificación de estos microorganismos [2].

Extracción de ADN genómico

Se recuperaron varias colonias representativas de los microorganismos en estudio para realizar la extracción de ADN genómico mediante los tres métodos incluidos en esta investigación. Las modificaciones correspondientes se describen a continuación.

Método de extracción por calentamiento

El protocolo de Armas y col. [3] fue modificado como se describe a continuación. En un tubo Eppendorf se colocaron 100 µl de agua destilada estéril. Se tomaron varias colonias de cada uno de los cultivos microbiológicos positivos y se homogeneizó el material por pipeteo. Posteriormente, se calentó a 100°C durante 15 min. Adicionalmente, se añadieron 900 µL de agua destilada estéril a cada tubo, se homogeneizó y se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm.

Método de extracción con CTAB

Se utilizó el método de extracción con CTAB reportado por Muñiz-Salazar y col. [4] con las siguientes modificaciones. Se pesó 0.1 g de la muestra microbiológica en un tubo Eppendorf, se agregó 0.85 ml de CTAB sin polivinilpirrolidona (PVP) y se llevó a incubación a 35°C durante una noche. Posteriormente, se agregó 0.6 ml de solución de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 11,000 rpm durante 3 min. El sobrenadante fue almacenado en congelación a -20°C hasta su uso. El ADN se diluyó en 0.7 ml de isopropanol y se incubó a en hielo durante 3 h, transcurrido este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min, se rehidrató en 500 µl buffer tris-EDTA pH 8 (TE) y nuevamente se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente, se rehidrató la pastilla con 100 µl de agua inyectable.

Método kit de purificación Wizard Genomic ADN (Promega Corporation)

Para este protocolo se utilizó una colonia independiente de cada microorganismo. Los microorganismos aislados fueron cultivados en medio líquido enriquecido durante 12 h a 37°C. Se siguieron las indicaciones del fabricante y el producto final se rehidrató con 20 µl de agua inyectable.

Cuantificación de pureza e integridad

La cuantificación de ADN se realizó utilizando un Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific Fisher). Se calculó la relación A260nm/A280nm, la cual debe tener un valor superior a 1.8, asumiendo que cuando el valor es igual a 2, el extracto es óptimo para posteriores procesos moleculares.

Funcionalidad del ADN purificado

Se realizaron ensayos de PCR para evaluar la calidad del ADN extraído por cada uno de los métodos utilizados. La reacción de PCR en 50 µl de mezcla incluyó una concentración de 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, 1X amortiguador de PCR, 300 ng de ADN bacteriano, 1.75 mM MgCl₂, 0.2 µM de cada uno de los primers y 1.25 U de ADN Amplificasa (kit BiotechMol). La mezcla se sometió a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 20 s, 58°C durante 20 s y 72°C durante 30 s y una extensión final a 72°C durante 5 min en un termociclador (Labnet, modelo Multigene Gradient TC9600-G). Los primers utilizados fueron sintetizados con base en el diseño de Chiang y col. [5].

Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica fue empleada para analizar la integridad del ADN y las amplificaciones de PCR. Los geles empleados se prepararon al 1.5% de agarosa. Las muestras fueron preparadas en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.0), como agente intercalante se utilizó bromuro de etidio (BrEt) con una concentración de 0.04 µg/ml. Para la homogeneización de las muestras, se añadió 3 µL de buffer de carga (Loading Buffer 6X) y se mezcló por pipeteo. Como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100 Kb ADN Ladder (NEB). Se empleó como buffer de corrida TAE 1X, el voltaje fue de 80 V por 1 h y los resultados fueron analizados mediante un transiluminador (Bencitos UVP) de luz UV con una longitud de onda de 302 nm.

Resultados y Discusión

Se obtuvo ADN libre de contaminación de ARN, no degradado, correspondiéndose la intensidad de la banda de ADN con la concentración de las muestras medidas espectrofotométricamente en todos los métodos analizados (Fig. 1, Tabla 1). Las modificaciones al método de extracción de ADN por tratamiento térmico produjeron bandas de baja intensidad en el análisis electroforético y los niveles de pureza fueron por debajo del valor recomendado. Mediante el método de CTAB se determinaron bandas integrales y niveles de pureza alrededor de 1.8. La disminución del tiempo de incubación en frío permitió acortar el tiempo de proceso de extracción y no modificó la calidad del ADN obtenido en comparación al protocolo original. Una ventaja de este método es que se realiza con reactivos comunes de laboratorio. El kit de purificación Wizard Genomic ADN produjo resultados óptimos en rendimiento (453 a 931 ng/µL), pureza ($A_{260}/A_{280} \geq 2.0$) y calidad (máxima intensidad e integridad de las bandas electroforéticas). Este kit ha sido el más usado en diversos estudios de biología molecular debido al poco tiempo que se necesita para la obtención del ADN purificado, genera altas concentraciones y muy buena calidad de material genético. Este método de extracción es recomendado en estudios donde el ADN obtenido es utilizado posteriormente en técnicas de PCR, secuenciación o clonación.

De los tres métodos utilizados, la mayor concentración de ADN fue de 930.8 ng/µL correspondiente al método del kit comercial y la menor fue de 65.9 ng/µL con el método por calentamiento. La digestión con RNasa a una concentración de 20 mg/ml a 37°C por una hora en los tres métodos favoreció la pureza del ADN obtenido.

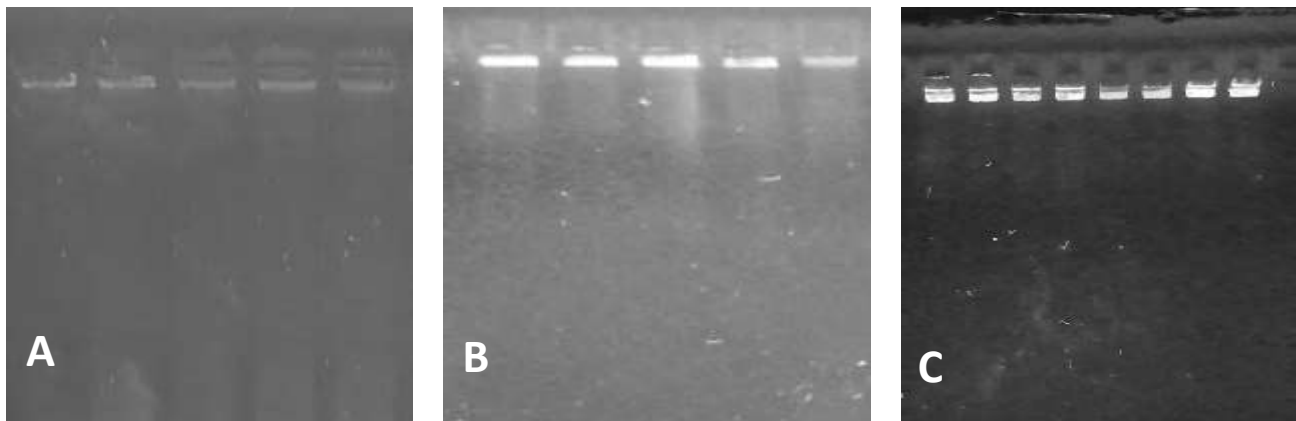


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de ADN genómico de bacterias extraído por los métodos de tratamiento térmico (A), CTAB modificado (B) y kit de purificación Wizard Genomic ADN (C).

Tabla1. Parámetros de cuantificación de concentración y calidad de ADN genómico bacteriano.

Método de extracción	Microorganismo	Tiempo de extracción (h)	Concentración ADN (ng/ μ L)	A260nm / A280nm	A260nm/ A230nm
Calentamiento	<i>Salmonella spp</i>	0.5	76.3	1.5	1.3
	<i>E. coli</i>		86.5	1.6	1.7
	<i>S. aureus</i>		65.9	1.4	1.6
	<i>L. monocytogenes</i>		83.2	1.5	1.7
CTAB	<i>Salmonella spp</i>	8.0	342.1	2.0	2.1
	<i>E. coli</i>		234.5	1.8	1.9
	<i>S. aureus</i>		352.4	1.7	2.0
	<i>L. monocytogenes</i>		231.3	1.8	1.9
Kit Wizard Genomic DNA	<i>Salmonella spp</i>	0.5	830.4	2.1	2.2
	<i>E. coli</i>		930.8	2.0	2.1
	<i>S. aureus</i>		453.5	2.0	2.1
	<i>L. monocytogenes</i>		674.7	2.0	2.0

Se utilizó una muestra de ADN de cada microorganismo con una concentración de 330 ng/ μ L para estandarizar las condiciones de amplificación de PCR. Las amplificaciones se realizaron mediante el ADN obtenido por el método de calentamiento. La Figura 2, muestra los tamaños de productos obtenidos: *E. coli* 420 pb, *L. monocytogenes* 473 pb, *Salmonella spp* 283 pb y *S. aureus* 130 pb.

Los resultados son semejantes a los reportados por Chiang y col. [5], quienes mediante PCR y PCR Multiplex detectaron la presencia de estos microorganismos en leche, así como Alonso y col. [6], quienes confirmaron la presencia de *Salmonella spp* y *L. monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en la vía pública en la ciudad de México.

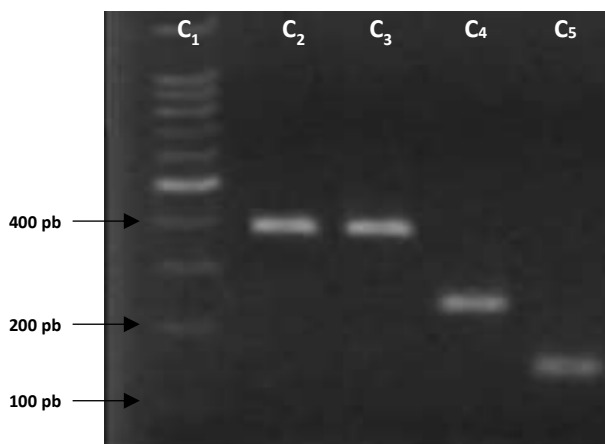


Figura 2. Electroforesis de productos de PCR para la identificación de microorganismos en muestras tratadas por el método de extracción de ADN por calentamiento. C₁) Marcador de peso molecular 100 pb NEB, C₂: *E. coli*, C₃: *L. monocytogenes*, C₄ *Salmonella spp.* y C₅: *S. aureus*.

Conclusiones

Los resultados de rendimiento, pureza y calidad del ADN obtenido fueron marcadamente superiores utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA (Promega Corporation), seguido por el método de CTAB. Sin embargo, a pesar de que la extracción de ADN mediante calentamiento produjo resultados menos positivos, es claro que este método puede utilizarse en la técnica de PCR para la detección de bacterias patógenas en alimentos.

Referencias

- [1] Palominio-Camargo C., González-Muñoz Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **31**(3): 535-546.
- [2] SSA. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación* 27-09-2010 (Segunda Sección): 1-129.
- [3] Armas Y., Capó V., López, L.X., Mederos, L., Díaz, R. (2011). Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. *Biotechnol. Apl.* **28**(1): 44-47.
- [4] Muñiz-Salazar R., Talbot, S.L., Sage G.K., Ward D.H., Cabello-Pasini, A. (2005). Population genetic structure of annual and perennial populations of *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California and the Gulf of California. *Mol. Ecol.* **14**(3): 711-722.
- [5] Chiang, Y.-C., Tsen, H.-Y., Chen, H.-Y., Chang, Y.-H., Lin, C.-K., Chen, C.-Y., Pai, W.-Y. (2012). Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. *J. Microbiol. Methods* **88**(1): 110-116.
- [6] Alonso Morales R., Rubio Lozano M., Núñez Espinosa, F., Alcázar Montañez, C. (2006). Detection of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* in fresh and semi-cured cheeses that are sold on the street markets in Mexico City. *Vet. Mex.* **37**(4): 417-429.