

DetECCIÓN ultra-rápida de *Listeria monocytogenes* en muestras de carne de cerdo en el sur de Sonora

Figueroa López, A.M.^{1*} • Flores Cervera, V.¹ • Chávez Almanza, A.F.¹ • Cantú Soto, E.U.¹

Palabras clave: listeriosis, carne, biosensor

Key words: listeriosis, meat, biosensor

Introducción

Listeria monocytogenes (*Lm*) es un bacilo corto, Gram positivo, no formador de esporas con capacidad de proliferar en condiciones desfavorables como altas concentraciones de sal, puede replicarse en un amplio rango de temperatura (-0.4°C a 45°C) y un amplio rango de pH (4.4 a 9.4) lo que contribuye a su incidencia en la industria alimentaria [1].

Lm es el patógeno intracelular facultativo responsable de la enfermedad llamada listeriosis, aunque poco frecuente la listeriosis es potencialmente mortal en personas inmunocomprometidas, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos mayores. Su principal vía de transmisión es mediante el consumo de alimentos contaminados como productos frescos, verduras congeladas, verduras de hoja verde, carne, productos lácteos, mariscos y alimentos procesados listos para consumo [2].

El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) reportó para el año 2017 un total de 2502 casos confirmados de listeriosis donde Alemania, Francia y España representan el 55% de casos confirmados [3]. Para el año 2019 el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) reportó un total de 880 casos confirmados en Estados Unidos [4].

El método estándar para la detección de *Lm* en alimentos es el ISO 11290-1, y en México se maneja un método similar descrito en la NOM 210-SSA1-2014, apéndice normativo C, que consiste en un enriquecimiento primario seguido por un enriquecimiento secundario, ambos en caldo selectivo Fraser, posteriormente, se evidencian los aislados sospechosos en medios selectivos sólidos PALCAM y ALOA y se concluye con la confirmación mediante pruebas bioquí-

¹ Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, calle 5 de febrero 818 sur, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México.

* alejandro.figueroa@itson.edu.mx



micas y hemólisis. El tiempo de confirmación puede ser mayor a 7 días, siendo este método muy laborioso y no representa una solución rápida y efectiva para la situación actual de la producción de alimentos y redes de distribución [5].

Para superar estos inconvenientes los métodos moleculares ofrecen una alternativa rápida, sensible y confiable para la detección, identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por alimentos. La gran mayoría de estos métodos se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre las variantes de la técnica la PCR por convección (cPCR) ha surgido como una alternativa al ciclado de temperaturas [6]. Al no existir una necesidad de calentar y enfriar repetidamente la reacción, esta herramienta molecular puede acortar drásticamente el tiempo de reacción [7]. Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo es estandarizar una metodología de detección ultra rápida de *Listeria monocytogenes* mediante la cPCR e inmunoensayos NALF, para determinar la incidencia de este patógeno en carne de cerdo proveniente de locales comerciales del sur de Sonora.

Metodología

Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa *Lm* ATCC 7644 como control positivo. Además, se usaron las cepas *Listeria innocua* ATCC 33091, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Escherichia coli* O157:H7 (cepa H28-1), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como controles negativos de reacción. Las cepas almacenadas a -70 °C fueron activadas en agar tripticasa de soya (TSA) (MCD LAB®, Cat. No. 7171) e incubadas a 36 °C por 24 h. Posteriormente, de una colonia aislada se inoculó un tubo con 5 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) (BD-DIFCO®, Cat. No. 2118245) y se incubó a 36°C por 24 h.

Extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico se realizó con el kit comercial Wizar Genomic DNA (Promega®, Cat. No. A1125) para bacterias Gram positiva y negativas siguiendo instrucciones del fabricante. La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel

de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.33 mg/mL y documentada con el sistema MiniBis pro DNR®. Posteriormente la concentración y pureza del ADN fueron determinadas mediante absorbancia con el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®) el ADN extraído se llevó a una concentración de 20 ng/μL.

Condiciones de la cPCR.

Las reacciones se llevaron a cabo en 20 μL. Los oligonucleótidos utilizados son específicos para el gen listeriolisina O (*hlyA*), *hlyA F* (5'-(6-FAM)-CGG-AGG-TCC-CGC-AAA-GAT-G-3') y *hlyA R* (5'-(Bios-g)-CCT-CCA-GAG-TGA-TCG-ATG-TT) que amplifica un fragmento de 230 pb. Se agregó 1 μL de ADN (20 ng/μL), 4 μL PalmTaq™ Express Master Mix 5X suplementado con MgCl₂ (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM) y Taq polimerasa (0.8 U) (Ahram Biosystems®, Cat. No. RK2010), 1 μL de cada oligonucleótido (10 μM) y agua ultra pura hasta 20 μL. Se utilizó el equipo Palm PCRTM G3 (Ahram Biosystems®). Las condiciones de reacción fueron un primer paso de 95 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos (11 minutos) a una temperatura de anillamiento de 58 °C, en velocidad T3. Posteriormente se analizaron dos microlitros de los productos en gel de agarosa al 1% como se menciona anteriormente y de manera simultánea se evaluaron otros 2 μL del producto mediante inmunoensayos NALF, este estudio se realizó por triplicado.

Especificidad de los oligonucleótidos.

Se evaluó la especificidad de la reacción con el método descrito anteriormente, usando ADN genómico de las cepas *Listeria innocua* ATCC 39091, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Escherichia coli* O157:H7 (cepa H28-1), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, del mismo modo los productos fueron simultáneamente evaluados en gel de agarosa e inmunoensayos NALF.

Sensibilidad del cPCR.

Para determinar la sensibilidad se calculó tamaño promedio en nucleótidos (nt) del genoma de 5 cepas de *Lm*, ATCC 7644, ATCC 15313, ATCC 1915, ATCC 51780 y la cepa ATCC 35152, según el portal de genomas ATCC <https://genomes.atcc.org/>. Dicho pro-

medio fue utilizado para la estimación del número de copias de ADN genómico presente en 1 μ L de ADN a una concentración de 20 ng/ μ L, utilizando la calculadora de número de copias para PCR tiempo real disponible en <http://www.scienceprimer.com/>. Para determinar el nivel mínimo de detección, se realizaron diluciones seriadas con agua ultra pura libre de nucleasas hasta dilución 100 de copias de ADN, usando 1 μ L de cada dilución para los ensayos de cPCR. Posteriormente se documentó el resultado por medio de electroforesis en gel de agarosa e inmunoensayos NALF, como se describe anteriormente.

Resultados y discusión

Se logró estandarizar el método de la cPCR con una temperatura de hibridación de 58 °C a 35 ciclos con velocidad de reacción T3, la reacción fue realizada utilizando 1 μ L de ADN (20ng/ μ L) de *Listeria monocytogenes* ATCC 7744 como control positivo y agua ultra pura como control negativo (Figura 1), se obtuvo un amplicón de 230 pb (Figura 1A) y los resultados de los inmunoensayos NALF (Figura 1B). La amplificación de cPCR tomó 11 minutos y el inmunoensayo NALF tomó menos de 5 min por lo que el tiempo total de la prueba fue de aproximadamente 16 min, muy similar al tiempo de detección de patógenos reportado por Kim et al. [6], que fue de 21 minutos.

La especificidad del ensayo se evaluó en gel de electroforesis e inmunoensayos NALF. Las reacciones de cPCR fueron negativas para los ADN de los aislados pertenecientes a otras especies bacterianas utilizados

excepto para *Lm* ATCC 7644 como se muestra en la Figura 2. Los resultados obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa (Figura 2A) fueron congruentes a los obtenidos mediante los inmunoensayos NALF (Figura 2B), ya que no se detectó un amplicón en el gel, ni formación de línea roja en bioensayos NALF con los distintos ADN de otros patógenos, demostrando la especificidad de los oligonucleótidos. La especificidad de la detección molecular de *Lm* depende en gran medida de la selección de ADN, en este trabajo seleccionamos el gen *hlyA* que codifica para listeriolisina O, gen implicado en el escape de la membrana vacuolar hacia la célula huésped[1], esencial para la virulencia de *Listeria monocytogenes*[8].

En la figura 3 se muestra el nivel mínimo de detección de 6.214×10^2 copias del genoma. La electroforesis en gel de agarosa (Figura 3A) muestra que los resultados son consistentes a los obtenidos con los inmunoensayos NALF (Figura 3B). El nivel mínimo de detección de nuestro ensayo para *Listeria monocytogenes* fue similar a los obtenidos por Kim et al. [6] quienes reportaron una sensibilidad de 3×10^1 copias del genoma para los patógenos *Salmonella Enteritis* y *Salmonella Typhimurium* donde los resultados obtenidos con análisis en gel de agarosa y en los inmunoensayos NALF fueron consistentes. Li et al. [2] desarrollaron un método para la detección de *Listeria monocytogenes* viables mediante inmunoensayos NALF amplificando el gen *hlyA* por PCR asimétrica donde reportaron un límite de detección de 3.5×10^3 UFC/mL.

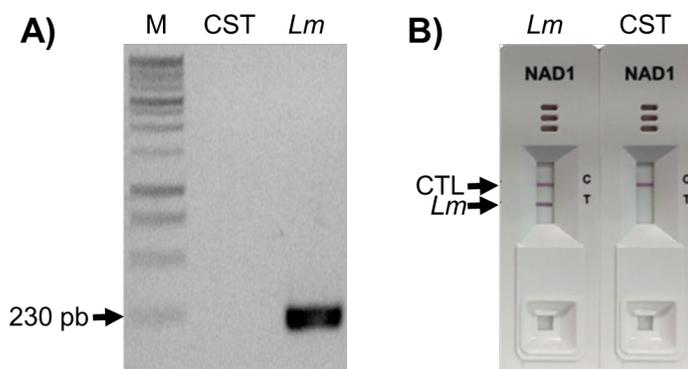


Figura 1. Optimización de la cPCR para *Lm*. Producto de cPCR para *Lm* analizado por electroforesis en gel de agarosa (A) e inmunoensayos NALF (B). M: Marcador molecular 1kb (Promega, Cat. G571A); CST: control sin templado; *Lm*: Muestra de ADN de *Lm*. CTL: control interno del inmunoensayo NALF.

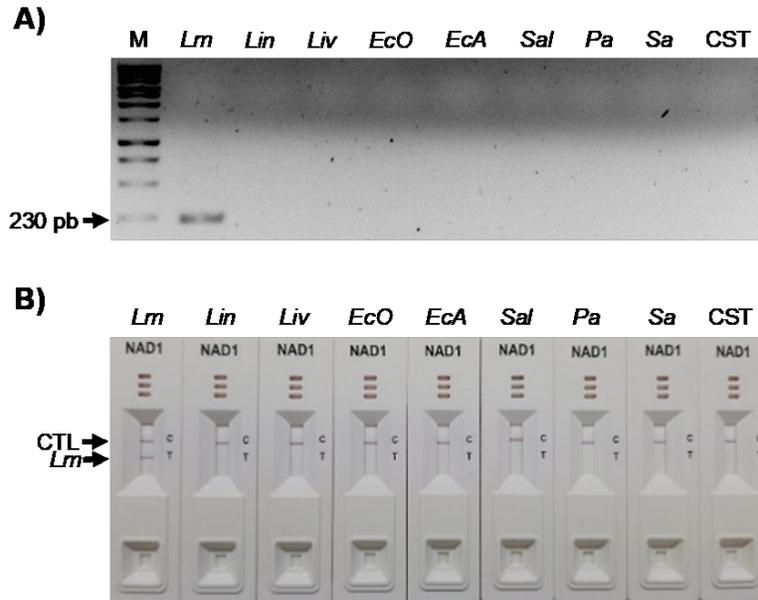


Figura 2. Especificidad de la reacción cPCR para *Lm*. A) Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de cPCR para los distintos patógenos. B) Ensayos NALF de las reacciones de cPCR para los distintos patógenos. M: Marcador molecular 1kb (Promega, Cat. G571A). *Lm*: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. *Lin*: *Listeria innocua* ATCC 33091. *Liv*: *Listeria ivanovii* ATCC 19119. *EcO*: *Escherichia coli* O157:H7 (cepa H28-1). *EcA*: *Escherichia coli* ATCC 25922. *Sal*: *Salmonella* ATCC 14028. *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Sa*: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. CST: Control sin templado. CTL: control interno del inmunoensayo NALF.

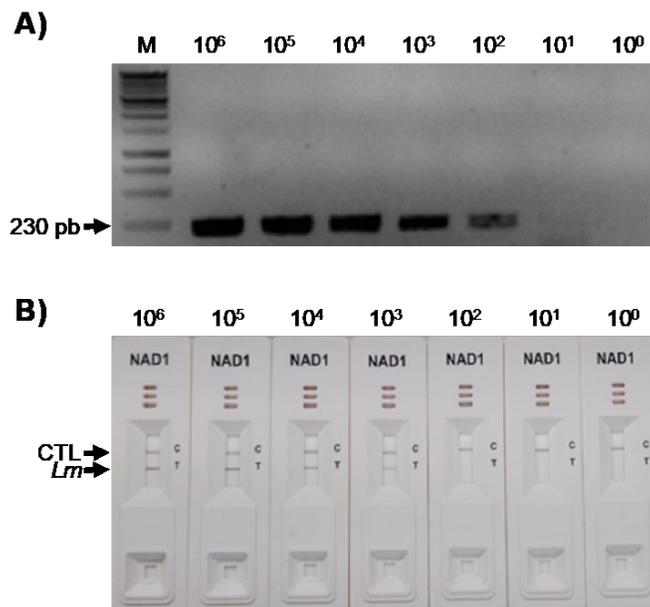


Figura 3. Nivel mínimo de detección (sensibilidad) de *Lm*. Los productos de cPCR analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (A) e inmunoensayos NALF (B); M: Marcador molecular 1kb (Promega, Cat. G571A).

Conclusión

Mediante la combinación de cPCR e inmunoensayos NALF desarrollamos un método ultra rápido, específico y de alta sensibilidad para la detección de *Listeria monocytogenes*. El tiempo combinado de la cPCR junto a los inmunoensayos NALF fue de aproximadamente 16 min, lo que lo hace significativamente más rápido que métodos convencionales para la detección molecular. Los casetes NALF evitan la dependencia de instrumentación para la electroforesis en gel de agarosa y combinado a la cPCR hacen de este méto-

do atractivo para su implementación en campo lo que podría permitir un mejor control y monitoreo en la producción de alimentos y redes de distribución.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo brindado para el desarrollo del proyecto a la empresa BIOERA México S.A. de C.V., distribuidor exclusivo en México de Ahram Biosystems.

Referencias

1. Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(1):32-46. doi:10.1038/nrmicro.2017.126
2. Li F, Li F, Luo D, Lai W, Xiong Y, Xu H. Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes*. *Analytica Chimica Acta*. 2018;1017. doi:10.1016/j.aca.2018.02.009
3. ECDC. *Listeriosis - Annual Epidemiological Report for 2017*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/listeriosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf>.
4. Centers for Disease Control and Prevention, National Notifiable Diseases Surveillance System. *Nationally Notifiable Infectious Diseases and Conditions, United States: Annual Tables*. . <https://wonder.cdc.gov/nndss/static/2019/annual/2019-table1.html>.
5. Gattuso A, Gianfranceschi MV, Sonnessa M, et al. Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2014;184:106-108. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.015
6. Kim TH, Hwang HJ, Kim JH. 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*. 2019;16(2):144-151. doi:10.1089/fpd.2018.2500
7. Muddu R, Hassan YA, Ugaz VM. Rapid PCR thermocycling using microscale thermal convection. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(49). doi:10.3791/2366
8. Chen JQ, Healey S, Regan P, Laksanalamai P, Hu Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*. 2017;6(2):39-59. doi:10.1016/j.fshw.2017.03.001