



Evaluación de la técnica PMA-qPCR para detectar y cuantificar *Escherichia coli* productor de toxina Shiga viable en hamburguesas de carne vacuna

Rey, M. A.^{1,2}; Cap, M.^{1,2}; Vaudagna S.R.^{1,2}; Mozgovej M.V.^{1,2}

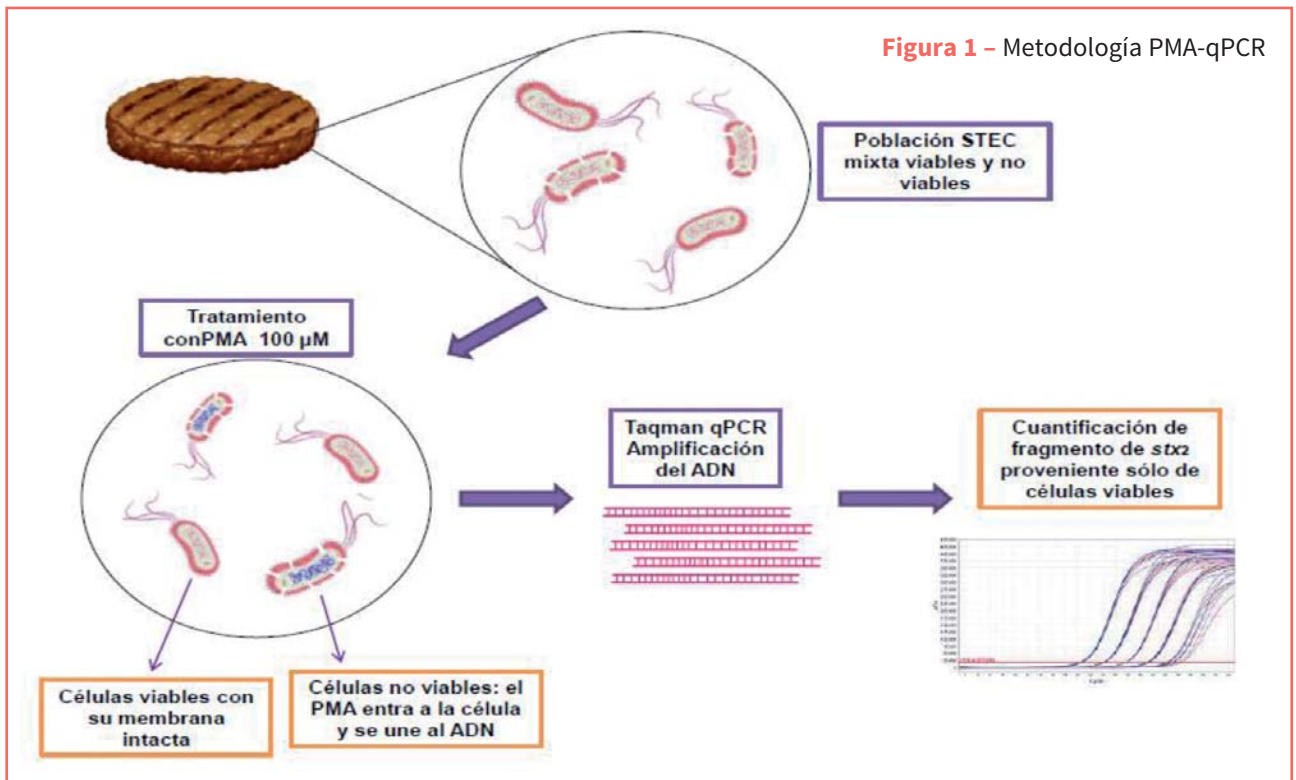
¹Instituto Tecnología de Alimentos – CIA - INTA Castelar. Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables (UEDD INTA-CONICET). Buenos Aires, Argentina.

rey.angeles@inta.gob.ar

Trabajo presentado en el Primer Simposio de Nuevas Tecnologías y Herramientas para el Aseguramiento de la Inocuidad y Seguridad Alimentaria. Septiembre 2021. Organizado por La Red de Inocuidad y Seguridad Alimentaria (RISA) de INTA

Figura 1 – Metodología PMA-qPCR



INTRODUCCIÓN

El PMA (*propidium monoazide*) es un colorante foto-reactivo que se intercala en el ADN bacteriano de las células muertas e inhibe su amplificación. Su selectividad se fundamenta en que la membrana bacteriana es impermeable al colorante por lo que este sólo puede penetrar células cuyas membranas se encuentren comprometidas. Una vez en el interior de la célula, se une al ADN irreversiblemente intercálándose entre las bases y formando un complejo PMA-ADN por efecto de una etapa de fotoactivación con fuente de luz azul LED. En este estado de unión, el ADN no puede amplificarse por PCR. En muestras con poblaciones mixtas de bacterias (vivas y muertas o injuriadas) el PMA permitiría la amplificación

por qPCR sólo de células viables con su membrana intacta (Figura 1). El objetivo del presente trabajo fue optimizar la metodología PMA-qPCR para evaluar la viabilidad de STEC en hamburguesas de carne vacuna.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo. Se trabajó con la cepa de STEC EDL 933. Una alícuota de inóculo de 8 log UFC/ml se colocó en baño seco a 95°C durante 10 minutos (muertas) mientras que se conservó otra alícuota sin inactivar (vivas) a la que se le realizó diluciones seriadas. Según el ensayo, se inocularon hamburguesas con la dilución correspondiente de células vivas y/o muertas.

División FRUTIHORTÍCOLA
Tecnología, innovación y eficiencia productiva

- € Líneas completas para el procesamiento de frutas: frutillas, arándanos, etc.
- € Sistemas de lavado para frutas, verduras y hortalizas
- € Túneles de congelado IQF para frutas y verduras, enteras o cubeteadas
- € Líneas de clasificación, tamaño y empaque de fruta congelada

- € Túneles hidrocooling para procesamiento de frutas y hortalizas
- € Equipos para escaldado por vapor o agua caliente
- € Plantas para elaboración de pulpas y néctares de frutas
- € Concentración de jugos y néctares

www.asema.com.ar

asema@asema.com.ar
Tel/Fax: +54 (0342) 490-4600

Ruta Prov. N°2 km 13
Monte Vera (3014) | Santa Fe, Argentina

Hamburguesas. Formulación con 70% carne picada magra, 20% grasa, 2% NaCl, 0,25% tripolifosfato de Sodio y 7,75% agua. Se realizaron homogenatos con las hamburguesas de 10 g inoculadas agregando 90 ml de agua peptona 0,1%.

Metodología PMA-qPCR

De los homogenatos de hamburguesa se tomaron alícuotas de 400 μL a las que se les adicionaron 100 μL de PMA Enhancer y PMAxx (Biotium, EE.UU.) para obtener una concentración final de 100 μM . Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, se expusieron las muestras a una fuente de luz LED azul durante 15 minutos para la fotoactivación del PMA. Se extrajo el ADN genómico de las muestras usando el kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Alemania). Para la PCR en tiempo real se utilizaron los primers y sonda descritos en la norma ISO 13136:2012 para detectar fragmentos de los genes *stx1* y *stx2*. También se usaron las temperaturas y tiempos de ciclado informados en la misma norma. Se realizó una curva standard para permitir la cuantificación de bacterias en las diferentes muestras. Para esto se utilizó un cultivo de STEC EDL 933 de concentración conocida a la que se le extrajo el ADN y luego se realizaron diluciones seriadas de este templado. La curva standard se corrió de forma tal de abarcar concentraciones de 2 a 9 log UFC/ml y luego poder interpolar en ella los valores de C_q (cycle threshold) obtenidos de las muestras.

Diseño experimental

Se realizaron cinco ensayos, por triplicado. Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA de una vía y test de Tukey.

Ensayo 1. Determinación de la concentración mínima de PMA necesaria para inhibir la señal de bacterias muertas inactivadas por calor.

- Para ello se evaluaron dos concentraciones de PMA (50 y 100 μM) y tres concentraciones de bacterias muertas inactivadas por calor (4, 5 y 6 log UFC/ml). Se incluyeron muestras sin tratar con PMA como control.

Ensayo 2. Evaluación de la interferencia del PMA en la amplificación de células viables.

- Fueron utilizadas cuatro concentraciones de bacterias viables, sin tratar y tratadas con PMA 100 μM .

Ensayo 3. Evaluación de la eficiencia del PMA para distinguir diferentes concentraciones de bacterias viables en presencia de una alta concentración de bacterias muertas inactivadas por calor en cultivo.

- Se prepararon siete muestras con mezclas de bacterias muertas inactivadas por calor en una única concentración (5 log UFC/ml) y concentraciones crecientes de bacterias vivas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 log UFC/ml). Se tomaron dos alícuotas de cada muestra, a una se la trató con PMA 100 μM y la otra permaneció sin tratar, como control.

Ensayo 4. Evaluación de la eficiencia del PMA para distinguir diferentes concentraciones de bacterias viables en presencia de una alta concentración de bacterias muertas inactivadas por calor en hamburguesa de carne vacuna.

- Idem ensayo 3, pero los inóculos de células vivas y muertas fueron agregados sobre homogenato de hamburguesa de carne vacuna.

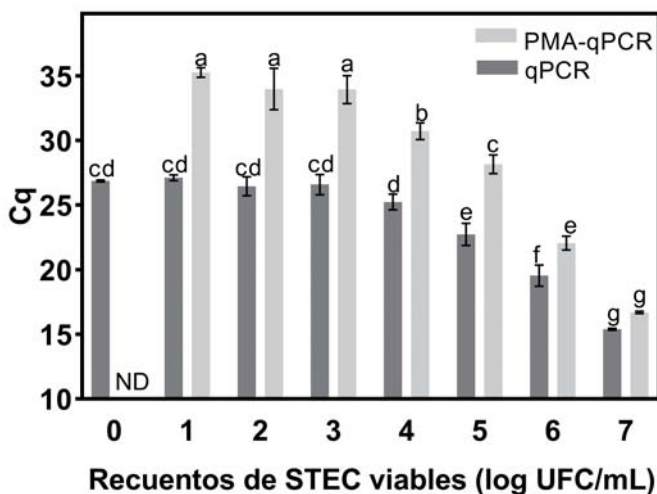
Ensayo 5. Evaluación de la eficiencia del PMA para distinguir entre bacterias viables y no viables dentro del mismo orden de concentración.

- Se realizaron dos grupos de homogenatos de hamburguesa inoculadas con tres mezclas de células de STEC viables y no viables en relación 25:75, 50:50 y 75:25. Un grupo fue tratado con PMA mientras el otro no, a modo de control.

RESULTADOS

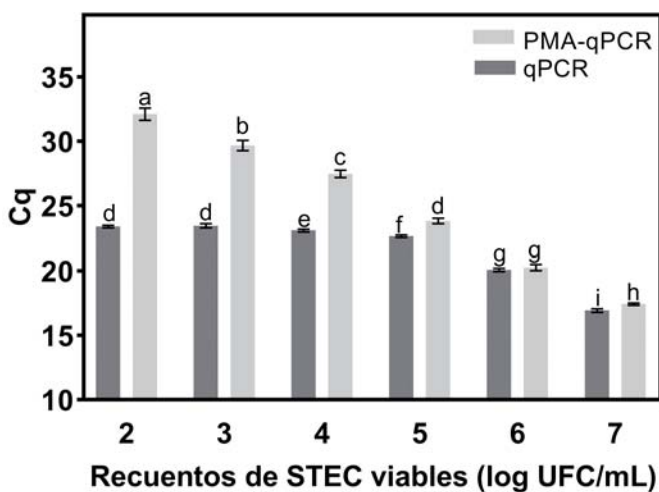
Ensayo 1. Con una concentración de PMA de 50 μM no fue posible inhibir completamente la señal proveniente de ninguna de las concentraciones de bacterias muertas ensayadas (4, 5 y 6 log UFC/ml). Al duplicar esta concentración de reactivo, hubo señal positiva de la muestra con 6 log UFC/ml de bacterias muertas pero no para 4 ni 5 log UFC/ml. Es decir que una concentración de 100 μM de PMA fue suficiente para inhibir hasta 5 log UFC/ml de bacterias muertas inactivadas con calor. En los siguientes ensayos se utilizó esta concentración de reactivo de trabajo, con la precaución de trabajar con concentraciones estimadas de células muertas iguales o menor a 5 log UFC/ml.

Figura 1 - Recuentos de STEC viables (log UFC/mL)



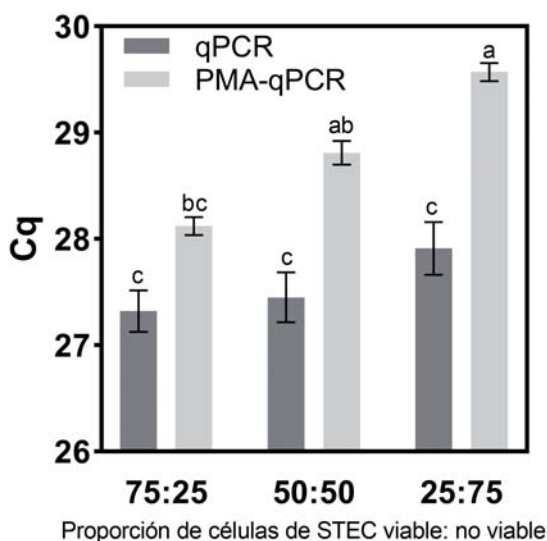
Ensayo 2. Se obtuvieron los resultados de Cq de las corridas por PMA-qPCR y qPCR de muestras inoculadas únicamente con bacterias de STEC vivas. Los valores obtenidos por ambas metodologías no presentaron diferencias significativas para un mismo orden de concentración. En conclusión, la incorporación del PMA no afectó la señal obtenida para bacterias vivas, verificando su imposibilidad de atravesar la membrana celular y de esta forma complejar el ADN dentro de la célula.

Figura 2 - Recuentos de STEC viables (log UFC/mL)



Ensayo 3. De los dos sets de mezclas de bacterias vivas y muertas, aquel sin PMA no presentó diferencias entre los valores de Cq de las muestras con 1,2 3 y 4 log UFC/mL de células viables. Diferencias significativas se encontraron entre los Cq de las muestras con 5, 6 y 7 log UFC/mL (Figura 1). Estas diferencias eran esperables puesto que la concentración de células viables en las últimas muestras era mayor que la de células muertas. Por el contrario, en las muestras tratadas con PMA, se obtuvieron señales positivas a partir de la concentración de 2 log UFC/mL de células viables en adelante. Se obtuvieron diferencias significativas en las muestras con 3, 4, 5, 6 y 7 log UFC/mL de células viables: mientras aumentaba la concentración de bacterias viables, los valores de Cq decrecían. Basándonos en estos resultados se pudo concluir que, bajo las condiciones experimentales ensayadas, el PMA permitió diferenciar efectivamente entre 3 y 7 log UFC/mL de células viables en presencia de una alta concentración de células muertas (5 log UFC/mL).

Figura 3 - Proporción de células de STEC viable: no viable



Ensayo 4. El diseño experimental fue similar al utilizado en el ensayo 3, con la diferencia de haber utilizado hamburguesas de carne vacuna inoculadas con las distintas concentraciones de bacterias vivas y muertas con el fin de evaluar la influencia de la matriz alimentaria en la cuantificación por PMA-qPCR. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos en el ensayo 3, sin el PMA no se pudieron ver diferencias entre las muestras con mezclas de células viables en concentraciones menores a 5 log UFC/mL de homogenato (Figura 2). La adición del PMA en las distintas mezclas permitió observar

Be sure. **testo**



Tecnología de medición para inspectores de alimentos

El trabajo de inspector de alimentos es muy exigente y, además de los conocimientos especializados necesarios, también se requiere la tecnología de medición correcta.

En Testo contamos con los instrumentos y el conocimiento para hacer de su trabajo algo más preciso y menos complejo.

www.testo.com/es-ar/sector-alimentario

Testo Argentina S.A.
Yerbal 5266 - 4° piso (C1407EBN) - Buenos Aires
Tel.: (011) 4683-5050 - Fax: (011) 4683-2020
info@testo.com.ar - www.testo.com.ar

señales significativamente diferentes en las muestras de todas las concentraciones ensayadas, con una tendencia lineal de pendiente 3.17 y $R^2 = 0.99$, similar a la curva standard. Basándonos en estos resultados, la matriz alimentaria no tuvo efecto sobre la amplificación del ADN proveniente de bacterias viables en distintos órdenes desde 3 a 7 log UFC/mL de homogenato en presencia de una alta concentración de bacterias muertas inactivadas por calor.

Ensayo 5. Las muestras en este ensayo fueron homogenatos de hamburguesa inoculados con distintas proporciones de bacterias viables y no viables dentro de un mismo orden de concentración. Sin el PMA, los valores de C_q para las tres mezclas, viables: no viables en relación 25:75, 50:50 y 75:25, fueron de 27.91, 27.45 y 27.32 respectivamente. Una vez incorporado el PMA, los valores de C_q aumentaban proporcionalmente a medida que la fracción de bacterias viables decrecía (C_q de 28.12, 28.81 y 29.57). Estos valores de C_q se corresponden con concentraciones interpoladas de la curva standard de 5.52, 5.32 y 5.10 log UFC/mL, los cuales eran consistentes con la cantidad de bacterias viables inoculadas en las muestras de homogenato (Figura 3). Estos resultados apoyan la hipótesis que el PMA permite distinguir entre el ADN de bacterias viables y no viables dentro de un mismo orden de concentración en muestras de hamburguesas de carne vacuna.

CONCLUSIONES

- La amplificación del ADN de bacterias de STEC inactivadas por calor fue completamente inhibida con el tratamiento con PMA 100 μ M.
- El PMA no afectó/interfirió la señal de qPCR obtenida a partir de células viables.
- La metodología PMA-qPCR pudo ser utilizada para diferenciar células viables de no viables tanto en cultivo como en homogenato de hamburguesa de carne vacuna, en distintos órdenes y en un mismo orden de concentración.
- Esta tecnología resulta promisoría para la detección y cuantificación rápida de STEC y podría utilizarse para evaluar la efectividad de distintos tratamientos usados para descontaminar productos cárnicos.