



Estandarización de PCR múltiple para identificación simultánea de los patógenos *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* en queso blanco

Standardization of multiplex PCR for simultaneous identification of the pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* in white cheese

MARÍA G. CESTARI^{*1}, MARIAM OTERO^{*2}, MARÍA G. TORRES^{*3}, GRICELIS P. MARTÍNEZ^{**4},
MARÍA I. CALDERÓN^{*}, MICHAEL R. MUJARES^{**5}

Resumen

La técnica de PCR múltiple (mPCR) constituye una alternativa rápida y específica para la identificación y la detección de agentes etiológicos y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez. Esta técnica forma parte de las herramientas analíticas que permiten la identificación de los patógenos transmitidos por los alimentos, siendo alternativas económicas, seguras y confiables para su aplicación en la industria alimentaria y los laboratorios de control. El objetivo fue estandarizar un método de PCR múltiple para identificar simultáneamente, en una misma mezcla de reacción, las bacterias patógenas *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) en una matriz de queso contaminada artificialmente y posteriormente enriquecida en agua peptonada. La dilución que reportó entre 10 y 250 UFC, fue la seleccionada para realizar la extracción de ADN, siendo esta la dilución la de 1×10^{-4} . Las bandas de los cultivos puros y de la PCR múltiple fueron detectadas mediante electroforesis utilizando un transiluminador UV. La estandarización del método para la matriz de queso se realizó inoculando la matriz con los microorganismos de interés, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, y la presencia de éstos se determinó luego a través de la PCR múltiple.

Palabras clave: mPCR, ADN, queso, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*

Abstract

The multiplex PCR (mPCR) technique is a rapid and specific alternative for identifying and detecting etiological agents and their virulence and resistance genotypes with great sensitivity and speed. This technique is part of the analytical tools that identify foodborne pathogens, being economical, safe, and reliable alternatives for their application in the food industry and control laboratories. The objective was to standardize a multiplex PCR method to simultaneously identify, in the same reaction mixture, the pathogenic bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) in an artificially contaminated cheese matrix subsequently enriched in peptone water. The dilution reported between 10 and 250 CFU was selected to perform the DNA extraction, this being the dilution of 1×10^{-4} . Bands from pure cultures and multiplex PCR were detected by electrophoresis using a UV transilluminator. Standardization of the method for the cheese matrix was performed by inoculating the matrix with the microorganisms of interest, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, and *E. coli*, and the presence of these was then determined by multiplex PCR.

Keywords: mPCR, DNA, cheese, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*

*Cátedra de Microbiología Aplicada, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. **Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. Correspondencia: mariag.cestari@gmail.com

Orcid: ¹[0009-0000-7549-9561](https://orcid.org/0009-0000-7549-9561) ⁴[0000-0002-8204-0174](https://orcid.org/0000-0002-8204-0174)

²[0009-0002-5124-6919](https://orcid.org/0009-0002-5124-6919) ⁵[0000-0002-0055-2804](https://orcid.org/0000-0002-0055-2804)

³[0009-0002-1195-5921](https://orcid.org/0009-0002-1195-5921)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.8](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.8)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 02/11/2024

Aprobación: 02/12/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 209-222. 2024

Introducción

El queso blanco fresco es uno de los quesos de mayor consumo en Venezuela, siendo que más del 50% de los hogares venezolanos consumen el queso duro llanero (Infante, 2020). La mayoría de estos productos se elaboran de forma artesanal, lo que aumenta las posibilidades de contaminación durante su proceso de elaboración, almacenamiento y distribución. La falta de conocimientos básicos sobre la inocuidad por parte de quienes elaboran alimentos se puede considerar como uno de los factores que más contribuyen a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's).

Entre los brotes de origen alimentario que representa un motivo de preocupación, la mayoría proviene de alimentos de origen animal, como carne de res, aves, huevos, leche cruda y productos lácteos, los cuales pueden estar contaminados por múltiples patógenos tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estos microorganismos se definen como patógenos importantes transmitidos por alimentos debido a la gravedad de las enfermedades y el número de casos que causan (Boukharouba y col., 2022). Los animales destinados a la alimentación son los principales reservorios de muchos patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos, y los productos alimenticios de origen animal son los principales vehículos de transmisión.

Los microorganismos patógenos causan infecciones humanas que se caracterizan principalmente por síntomas gastrointestinales que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, además de otras manifestaciones clínicas como calambres abdominales y otros síntomas específicos

del agente. Algunas bacterias pueden causar complicaciones graves e incluso la muerte (Abebe y col., 2020). Para poder garantizar la seguridad alimentaria y evitar enfermedades transmitidas por estos, es fundamental un proceso de detección rápida y precisa de los diversos agentes patógenos (Fung y col., 2018; Hu, 2019). Más del 90% de las enfermedades por intoxicación alimentaria podrían ser causadas por especies de *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* spp., *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Vibrio*, *Bacillus* y *E. coli* (Abebe y col., 2020; Bendary y col., 2022; Bintsis, 2017; Chlebcicz y Śliżewska, 2018; Fung y col., 2018), mientras que el restante de las ETA's son causadas por los virus de Hepatitis A y Norovirus, y los parásitos *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Trichinella spiralis*, entre otros (Bintsis, 2017).

Entre los microorganismos de interés está la *Escherichia coli* O157:H7 ya que constituye un patógeno importante transmitido por los alimentos. *E. coli* O157:H7 se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida y leche cruda. La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados), también es causa de infecciones. Ejemplos de alimentos implicados en brotes de *E. coli* O157:H7 son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado con leche cruda. La mayoría de las infecciones relacionadas con este patógeno se deben al consumo de leche, carne molida, agua y otros productos lácteos contaminados. Se ha determinado

que incluso en dosis bajas de 1 a 100 unidades formadoras de colonias (UFC), puede causar enfermedad (Moezi y col., 2019). La *E. coli* O157:H7, así como las Shiga toxina producida por *E. coli* (STEC) patogénicas distintas a O157:H7 pueden causar complicaciones potencialmente mortales, como diarrea sanguinolenta (colitis hemolítica) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Li y col., 2017).

La leche, el queso, la carne, la nata y los alimentos listos para el consumo son la razón principal de la infección humana por *Listeria monocytogenes*, que afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores y personas con el sistema inmunitario debilitado. La listeriosis es una enfermedad de naturaleza no entérica, que puede llegar al torrente sanguíneo y causar septicemia o al cerebro y causar meningitis o encefalitis (Fox y col., 2021).

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* produce una amplia gama de exotoxinas, incluidas las enterotoxinas resistentes al calor que pueden provocar intoxicación alimentaria. El principal reservorio es el hombre (piel y superficies mucosas) convirtiendo a los manipuladores de alimentos en los mayores agentes transmisores; no obstante, también es vehiculizado por alimentos con alto contenido proteico principalmente carnes, leche y sus derivados (Fetsch, 2018; Yoon y col., 2018; Liu y col., 2021).

Según la Norma COVENIN 3821-2003 para queso blanco, los criterios microbiológicos indican que se debe realizar el análisis de forma recomendada para *E. coli* y de forma obligatoria para *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Recientemente se han desarrollado métodos moleculares que han mostrado ser rápidos, específicos y sensibles para la detección simultánea de diversos patógenos y/o sus toxinas, demostrando que tienen un alto potencial en la investigación de brotes de origen alimentario, el análisis de alimentos y control de alimentos. Entre estos métodos están la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (qPCR), PCR digital, secuenciación genómica completa (WGS), secuenciación de nueva generación (NGS), la edición genómica CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, por sus siglas en inglés), y microarreglos de ADN, para detectar diversos patógenos causantes de ETAs en una amplia variedad de productos alimenticios (Patel y col., 2016; Hu y col., 2018; Liu, 2021; Shin y col., 2022; Xiong y col., 2022; Boukharouba y col., 2022; Rahman y col., 2022).

La PCR ha revolucionado el análisis microbiológico permitiendo la detección de microorganismos patógenos en alimentos, sin la necesidad del aislamiento e identificación clásicos (Chapela y col., 2015). El método de PCR se puede utilizar para la detección de patógenos moleculares comparando el tamaño del ADN objetivo con marcadores o comparando la secuencia de ADN objetivo con las secuencias contenidas en el banco de genes. La qPCR permite observar cada ciclo de amplificación de ADN con un sistema informático para ver la secuencia del producto de la PCR. La qPCR es reconocida como una técnica altamente específica y sensible que se puede completar en una hora después del proceso de enriquecimiento del microorganismo. Su potencial para la automatización también lo hace adecuado para la detección de un gran número de muestras de alimentos (Lopes y

col., 2019). Los métodos de prueba basados en PCR pueden detectar microorganismos patógenos mediante la identificación de secuencias de ADN diana. El método de la PCR permite detectar diversos microorganismos, incluyendo patógenos humanos viables pero que no son cultivables por los métodos tradicionales (Zhong y Zhao, 2018; Lv y col., 2020; Gao y col., 2021a, b; Ou y col., 2021).

En la actualidad, la PCR y la qPCR son herramientas analíticas esenciales para los investigadores que trabajan en la identificación de los patógenos transmitidos por los alimentos, siendo alternativas económicas, seguras y confiables para su aplicación en la industria alimentaria y los laboratorios de control. Este método tiene la ventaja de su mayor rapidez, menor consumo de muestra, alta selectividad y alta sensibilidad, respecto a los métodos tradicionales de cultivo (Moezi y col., 2019; Stingl y col., 2021). Adicionalmente, la qPCR múltiple permite la detección simultánea de más de un patógeno y sus toxinas en una sola reacción, ahorrando esfuerzo, tiempo y dinero (Chapela y col., 2015).

La PCR múltiple ha ganado gran aceptación y uso debido a su capacidad de diferenciación potencial y confiabilidad entre diversos patógenos y sus toxinas (Rao y Arora, 2020). Esta técnica ha demostrado diversas ventajas para la detección de patógenos causantes de ETA, debido a su bajo costo y la necesidad de un pequeño volumen de muestra para la realización de diversos experimentos en simultáneo (Chen y col., 2021). La mPCR ha sido utilizada para la determinación simultánea de varios genes diana en el esquema de detección de PCR para *E. coli* O157:H7, incluidos los genes de la toxina Shiga (*stx1* y *stx2*) (Anklam y col., 2012; Li y col., 2017; Fung y col., 2018).

Recientemente, fue desarrollado un método de PCR múltiple en tiempo real (mqPCR) para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), después del pre-enriquecimiento de 16h, utilizando sondas TaqMan. Las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis y son oligonucleótidos que contienen una fracción fluorescente donante en el extremo 5' y una fracción fluorescente aceptora en el extremo 3' que apaga la fluorescencia emitida por la molécula donante debido a su proximidad, diseñadas para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa (Liu y col., 2019). Liu y col., 2019 en su estudio lograron una elevada sensibilidad en la detección de los cuatro patógenos en leche contaminada, obteniendo un límite de detección de 1 unidad formadora de colonia (UFC)/25 mL para cada patógeno, y en los ensayos de inclusividad y exclusividad obtuvieron un valor cercano al 100% (Parichehr y col., 2019).

Es por ello, que el presente trabajo pretende diseñar ensayos rápidos, validados y de calidad en el área de microbiología de alimentos, que permitan dar resultados precisos en pocas horas, lo cual representará una gran ventaja económica y la garantía del cumplimiento de la calidad microbiológica a las empresas productoras y agencias regulatorias. La creación de redes de laboratorios de excelencia para el análisis de alimentos a nivel nacional permitirá garantizar un seguimiento continuo de la seguridad alimentaria en nuestro país, lo que podría desempeñar un papel importante en la prevención de riesgos potenciales para la salud de los consumidores, así como de costes económicos innecesarios.

Por lo anterior, se planteó como objetivo estandarizar un método de PCR múltiple para la identificación simultánea de 3 patógenos transmitidos por alimentos de interés para la salud pública en Venezuela: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, de manera rápida y simple.

Para ello, se procedió a 1) Optimizar las condiciones de extracción del material genético de *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*; 2). Determinar la concentración de la suspensión bacteriana de la muestra a utilizar para realizar la extracción de ADN bacteriano; 3) Definir la concentración mínima necesaria del material genético requerido para el método de PCR múltiple para la detección de 3 patógenos transmitidos por alimentos a través de la matriz alimentaria queso blanco fresco: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*; 4) Estimar la sensibilidad y especificidad del método de PCR múltiple utilizando diferentes cepas de referencias; y 5) Realizar la detección simultánea de los 3 patógenos a evaluar en una sola reacción por PCR múltiple.

Metodología

MICROORGANISMOS

Con la finalidad de estandarizar las condiciones de la mPCR se trabajó primeramente con cultivos puros de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, provenientes del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) y del Cepario del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, de la Facultad

de Farmacia de la UCV. Los cultivos puros de cada uno de estos microorganismos fueron crecidos en caldo nutritivo (37°C) y caldo nutritivo al 0,6% de extracto de levadura (37°C) para *L. monocytogenes*, para la posterior inoculación de 100µL de cada microorganismo de la muestra de alimento, queso blanco fresco.

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la efectividad de la PCR múltiple se aislaron e identificaron los microorganismos patógenos predominantes en la matriz alimentaria de consumo masivo a analizar, como el queso blanco fresco. Las cepas aisladas de la matriz alimentaria en estudio se identificaron a través de la metodología tradicional, mediante recuento en placas con agares específicos para cada microorganismo en estudio: *Escherichia coli*: Agar MacConkey (37°C); *Listeria monocytogenes*: Caldo Nutritivo al 0,6% en Extracto de levadura, Agar Oxford (37°C); y *Staphylococcus aureus*: Agar Baird Parker (37°C) y se utilizaron para experimentos de inoculación posteriores de la misma forma que los cultivos puros.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se prepararon cultivos puros frescos mediante la inoculación por separado de una colonia aislada de cada microorganismo en 100 mL de Caldo Nutritivo, luego se incubaron por 24 horas a 37 °C *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; y 48h a 30 °C *L. monocytogenes*. Para comprobar el crecimiento se comparó la turbidez con una escala de referencia de suspensiones bacteriológicas de McFarland. La concentración requerida para la extracción del ADN y posterior realización de la PCR es de 108 y 109 UFC.

Una vez obtenidos los cultivos puros, se inocularon 100 μ L de cada una de las cepas de los tres microorganismos a estudiar en 25 gramos de una muestra representativa de queso blanco fresco, la cual se dejó en reposo por una hora.

Posteriormente, el tratamiento de la muestra de queso blanco fresco se procedió según lo estipulado en la Norma COVENIN 1126-89, en la cual se establece pesar 25 gramos de muestra en una bolsa de polietileno (previamente identificada) y añadir 225mL de agua peptonada estéril, llevar al Stomacher por 60 segundos para homogeneizar la muestra y dejar en reposo por 1 hora. Esta preparación corresponde a la dilución 1x10⁻¹. Se realizaron las diluciones seriadas correspondientes hasta 1x10⁻⁹ para *E. coli* y *S. aureus*, mientras que para *L. monocytogenes* se realizaron hasta la dilución 1x10⁻⁶. Posteriormente, se realizaron siembras por superficie de cada una de las diluciones en los agares selectivos correspondientes; *Escherichia coli*: Agar MacConkey (37°C); *Listeria monocytogenes*: caldo nutritivo al 0,6% de extracto de levadura, Agar Oxford (37°C); y *Staphylococcus aureus*: Agar Baird Parker (3 °C). La siembra en cada agar selectivo fue de 0,1mL de cada dilución.

EXTRACCIÓN DE ADN

Las extracciones de ADN de los cultivos puros de bacterias patógenas y de la muestra de queso, se realizaron con un Kit gBAC Mini ADN Bacteria (IBI Scientific, Iowa, Estados Unidos), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

En el caso de la muestra, se seleccionó la dilución 1x10⁻⁴ se corresponde con una concentración entre 108 y 109 UFC, de

acuerdo con los requerimientos del kit. La calidad del ADN se evaluó midiendo la tasa de A260/A280 en un espectrofotómetro ultravioleta Beckman Coulter™ DU® 530 *Life Science UV/Vis Spectrophotometer* (California, USA) y se detectó la integridad con electroforesis en geles de agarosa al 2%. El ADN genómico (ADNg) de las cepas evaluadas se almacenaron en congelador hasta su análisis mediante mPCR.

PRIMERS

La mPCR se llevó a cabo con la combinación de 3 pares de cebadores específicos en una reacción (Tabla I). Para la detección de los patógenos se usaron los cebadores dirigidos a los genes: *E. coli* GADA 670-F/R dirigido al gen que codifica la enzima glutamato descarboxilasa (*gadA*), los cebadores Nuc 484-F/R, dirigido al gen codificante de la nucleasa termoestable (*nuc*) de *S. aureus* y cebadores LM 404-F/R dirigido al gen de la listeriolisina (*lisA*) para la detección de *L. monocytogenes*. Las especificidades de los cebadores se analizaron a través de: Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para evitar la aparición de productos no específicos o formación de dímeros de primer. Las secuencias de los cebadores empleados para la detección de los tres (3) organismos patógenos se muestran en la Tabla I. Todos los cebadores fueron adquiridos de Alfa Quantum C.A., los cuales fueron sintetizados por Macrogen (Caracas, Venezuela).

Sistema de Reacción y Condiciones

PCR SIMPLE

La validación de los cebadores se realizó de manera individual por PCR simple, se

Tabla I.
Cebadores para utilizar para la detección de los 3 patógenos de interés

Cepa	Gen	Secuencias 5'	3'	Longitud	Referencia
<i>E. coli</i>	GADA/F	ACCTGCGTTGCGTAAATA		670 pb	McDaniels y col., 1996
	GADA/R	GGGCGGGAGAAGTTGATG			
<i>S. aureus</i>	Nuc/F	CTTAGCCAAGCCTTGACGAAC		484 pb	Xu y col., 2006
	Nuc/R	AAAGGGCAATACGCAAAGAGGT			
<i>L. monocytogenes</i>	LM404/F	ATCATCGACGGCAACCTCGGAGAC		404 pb	Wu y col., 2004
	LM404/R	CACCATTCCAAGCTAAACCAGTGC			

preparó una mezcla de reacción para cada patógeno de manera independiente que contenía 25 μL de EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix (LUCIGEN), 0,5 μL de los cebadores, para un volumen final de 50 μL . Se utilizó para el control negativo de la PCR, agua libre de ADN en lugar de la muestra del ADN de los patógenos. Las condiciones de amplificación fueron las mismas para cada patógeno, la cual correspondió a desnaturalización inicial 94°C por 2 min, entre 30 y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, variando las temperaturas de hibridación entre 58°C y 60°C por 30 segundos, extensión 72°C por 1 minuto y una extensión final de 7 minutos a 72°C. La amplificación se realizó en el termociclador (*Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China*).

Después de la amplificación se tomó el ADN amplificado y se mezcló en una proporción 1:1 con buffer de carga, se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando SYBR Safe DNA Stain (BioLund Scientific LLC) como marcador fluorescente para evidenciar las bandas mediante un transiluminador UV (Transilluminator Model M-20 95-0216-01, Upland, C.A 91786, USA).

PCR MULTIPLEX

La PCR multiplex (mPCR) fue desarrollada para la detección simultánea de los 3 patógenos en una sola reacción. Las condiciones de la mezcla de reacción y amplificación fueron realizadas como fue descrito por Boukharouba y col., 2022. Se realizó una mezcla de reacción para un volumen final de 50 μL , que contenía 25 μL de EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix, la concentración de los cebadores era: GADA670 0,5 μL de cada cebador, Nuc484 0,5 μL de cada cebador, LM404 0,5 μL de cada cebador; 10 ng de ADN extraído y Agua Libre de Nucleasa. Para el control negativo de la reacción se utilizó Agua Libre de Nucleasa. La amplificación por PCR se realizó manteniendo las mismas condiciones especificadas en la PCR simple. Una vez completada la reacción, todos los productos de amplificación de PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando SYBR Safe DNA Stain, y se visualizó bajo un transiluminador (Transilluminator Model M-20 95-0216-01, Upland, C.A 91786, USA).

ESPECIFICIDAD DE LA mPCR

Para evaluar la especificidad de la mPCR se confirmó la selectividad de cada cebador mezclando los 3 pares de cebadores con varias combinaciones aleatorias de ADN de control positivo y luego amplificando con las condiciones estandarizadas de la mPCR. El ADN extraído de cultivos puros de los 3 patógenos estudiados se emplearon como control positivo.

Luego se tomaron otras cepas disponibles de aislamientos del laboratorio de la cátedra de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Farmacia UCV y las suministradas por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, para la evaluación de la especificidad.

SENSIBILIDAD DE LA mPCR

La sensibilidad se evaluó, en primer lugar, utilizando el ADN extraído por separado de los 3 cultivos puros en caldo nutritivo, para determinar los límites de detección de cada PCR simple y mPCR. Posteriormente, se realizaron pruebas utilizando ADN extraído de co-cultivos realizados en agua peptonada con y sin matriz alimenticia inoculada artificialmente.

Resultados

SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Luego de realizarse las siembras de los agares selectivos de la muestra de queso blanco fresco, se procedió a seleccionar la dilución que reportó entre 10 y 250 UFC, siendo esta la dilución 1×10^{-4} , la cual

reportó un contaje promedio de 214 UFC para *S. aureus* en Agar Baird-Parker, para *E. coli* se obtuvo un promedio de 10 UFC en el Agar MacConkey y 12 UFC para *L. monocytogenes* en Agar Oxford Modificado (Figuras 1 y 2).

CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO EXTRAÍDO

Se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría UV a longitudes de onda de 260nm y 280nm de varios ADN genómicos extraídos con el kit, y se seleccionaron para la PCR aquellas muestras que reportaron una tasa superior a 1,7 y concentraciones para cumplir con los requerimientos del kit de la master mix para PCR (10ng/ μ L de ADN).

Los resultados mostraron la detección de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* y que la intensidad de las bandas disminuye a medida que disminuyen las concentraciones de ADN colocadas en cada carril (Figuras 3A y 3B).

ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES POR EL ADN BACTERIANO

Para determinar los límites de detección de cada PCR simple en condiciones optimizadas se realizaron varias electroforesis en gel de agarosa al 2%, siguiendo un gradiente decreciente del ADN utilizado en las reacciones. Las cantidades de ADN utilizadas en cada mezcla se calcularon experimentalmente a partir de la concentración mínima de ADN requerido para el método de mPCR.

En cuanto a la especificidad, se realizaron diversas electroforesis utilizando variedad



Figura 1. Recuento en placas de las diluciones seriadas de la muestra de queso blanco fresco para *S. aureus* en Agar Baird Parker y *E. coli* en Agar MacConkey. De izquierda a derecha desde la dilución 1×10^{-1} hasta la 1×10^{-9} , por duplicado



Figura 2. Recuento en placa de las diluciones seriadas de la muestra de queso blanco fresco en Agar Oxford para *L. monocytogenes*. De izquierda a derecha desde la dilución 1×10^{-1} hasta la 1×10^{-6}

de cepas de referencia obtenidas del Cepario de la Cátedra de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Farmacia de la UCV y del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Figura 4).

En la corrida electroforética de la Figura 5 se pudo observar que la PCR amplificó para las bandas correspondientes a 404pb para *L. monocytogenes*, 484pb para *S. aureus* y 670 pb para *E. coli*, por lo que se evidencia que en el pool de cepas puras control, se logran observar las tres bandas pertenecientes a cada microorganismo estudiado, confirmando que los cebadores reconocen el material genético específico para cada uno.

En la corrida electroforética de la Figura 6 de la muestra de queso y controles, se

logró observar las bandas correspondientes a 404pb para *L. monocytogenes* y 484pb para *S. aureus*, más no se evidencia la banda perteneciente a 670 pb para *E. coli*.

PCR Simple y PCR Multiplex

PCR SIMPLE

En primer lugar, se aplicó la detección por PCR simple de cultivos puros individuales para verificar el correcto rendimiento de cada par de cebadores y el rendimiento del método de extracción de ADN. Los resultados demostraron que la amplificación específica de *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* produjo amplicones de diferentes tamaños, correspondientes a 670 pb, 484 pb y 404 pb, respectivamente, que aparecen como

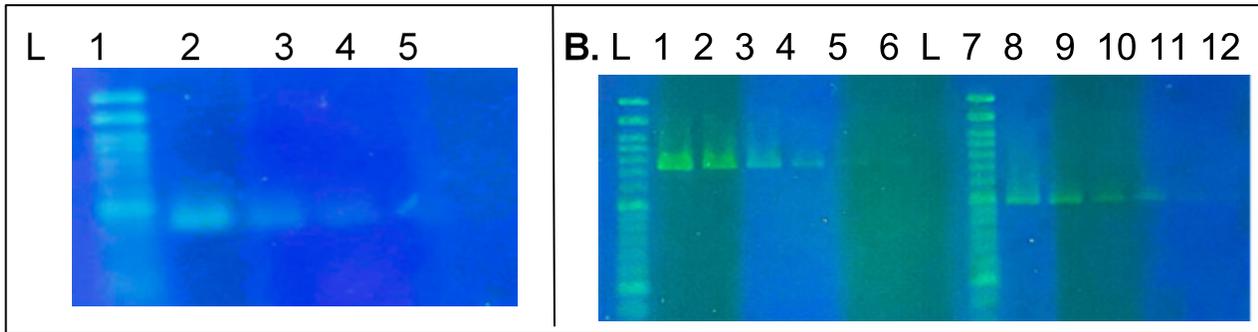


Figura 3. A. Detección de la sensibilidad de los primers para *Listeria monocytogenes* amplificada LM 404 bp, marcador de 50pb., banda 1 al 5 de la concentración 9,86 ng/μL hasta 1,95 ng/μL. **B.** Detección de la sensibilidad de los primers para *Escherichia coli*, GADA 670 bp y *Staphylococcus aureus* Nuc 484 bp. L, marcador de 50pb., banda 1 a la 6, de la concentración 28,2 ng/μL hasta 3,71 ng/μL; banda de 7 a la 12, de la concentración 5,27 ng/μL hasta 0,69 ng/μL

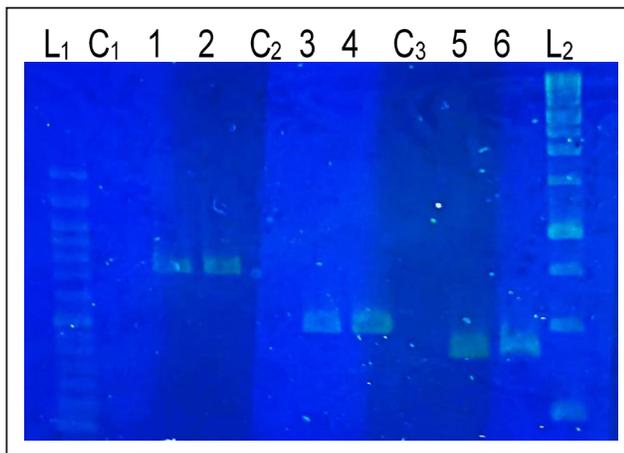


Figura 4. Determinación de la especificidad de los cebadores de *E. coli* GADA 670pb, *S. aureus* Nuc 484pb y de *L. monocytogenes* LM 404 pb, por las cepas puras individuales. L₁, marcador de 50pb, C₁, control negativo de *E. coli*, 1 y 2, cepa pura de *E. coli* amplificada; C₂, control negativo de *S. aureus*, 3 y 4, cepa pura de *S. aureus* amplificada; C₃, control negativo de *L. monocytogenes*, 5 y 6 cepa pura de *L. monocytogenes* amplificada, L₂, marcador de 1kp

bandas distintas en el gel de electroforesis, sin ningún producto no específico. En la Figura 4 se observa dicho rendimiento.

mPCR

Después de validar los cebadores mediante PCR simple, se realizó la multiplexación llevando a cabo mediante una integración progresiva de cebadores

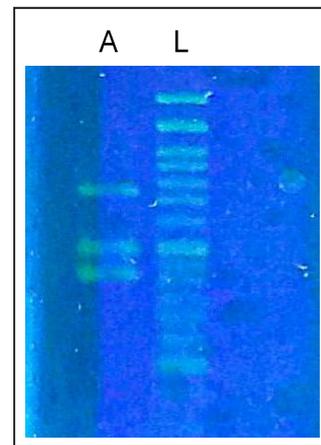


Figura 5. Determinación de la especificidad de los cebadores de *L. monocytogenes* LM404 a 404bp, *S. aureus* Nuc 484 bp y *E. coli* GADA 670 bp en un pool de microorganismos. A, pool de las cepas puras en estudio, *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*; L, marcador de 50pb

que se mezclaron en una sola reacción con sus respectivos ADN diana (PCR multiplex). Para asegurar la amplificación de los tres fragmentos objetivo y para evitar reacciones no específicas, la temperatura de hibridación se optimizó en el equilibrio de concentración de los tres pares de cebadores en la reacción.

En la detección por mPCR de los microorganismos patógenos a partir del pool de cepas puras se observaron las tres bandas correspondientes a *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. Dicha detección obedece a la Figura 5.

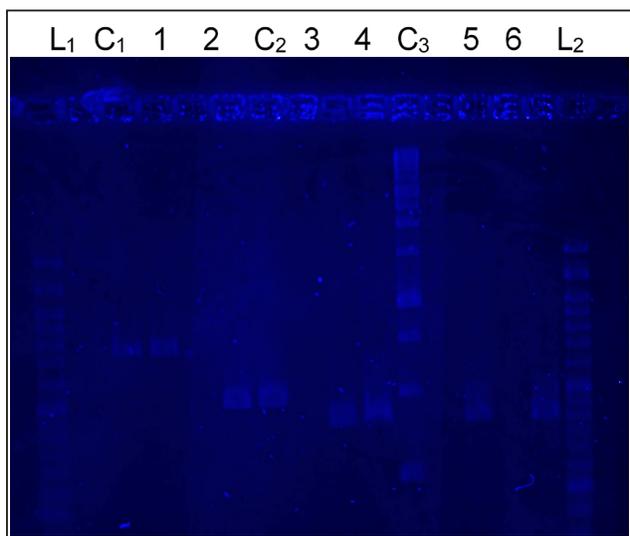


Figura 6. Determinación de la especificidad de los cebadores de *L. monocytogenes* LM404 a 404bp, *S. aureus* Nuc 484 bp y *E. coli* GADA 670 bp en una muestra de queso blanco fresco en comparación con las cepas puras individuales de los microorganismos. L₁, marcador de 50pb, C₁, control negativo de *E. coli*, 1 y 2, cepa pura de *E. coli* amplificada; C₂, control negativo de *S. aureus*, 3 y 4, cepa pura de *S. aureus* amplificada; C₃, control negativo de *L. monocytogenes*, 5 y 6 cepa pura de *L. monocytogenes* amplificada, L₂, marcador de 1kp; C₄, control negativo de muestra A; A, muestra de queso con ADN amplificado; C₅, control negativo de muestra B; B, muestra de queso con ADN amplificado

En la corrida electroforética de la muestra de queso blanco fresco (Figura 7) se observaron correctamente las bandas de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, sin evidencia de la banda correspondiente a *E. coli* (duplex PCR).

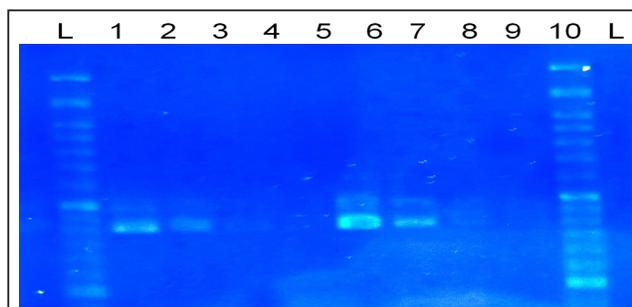


Figura 7. Detección de microorganismos patógenos *L. monocytogenes* (cebador LM404 a 404bp) y *S. aureus* (cebador Nuc 484 bp) en la muestra de queso blanco fresco inoculada. L, marcador 50pb; bandas de 1 a 5 correspondientes a la muestra A de queso blanco; bandas de 6 a 10 correspondientes a muestra B de queso blanco; L, marcador de 50pb

Discusion y Conclusiones

La utilización del método de PCR permite obtener resultados más rápidos, dado que el método tradicional de recuento en placas, que requiere de la confirmación de los resultados mediante pruebas bioquímicas, alarga el tiempo para la identificación y reporte de los microorganismos de interés (Aladhadh, 2023).

La estandarización del método para la matriz de queso se realizó inoculando la matriz con los microorganismos de interés, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, y la presencia de éstos se determinó luego a través de la PCR múltiple.

Los primeros resultados están relacionados a la detección del número de UFC de cada microorganismo, que se determinó mediante una dilución seriada 1:10 en caldo nutritivo, seguida de la siembra de 0,1 mL de cada dilución para obtener un recuento de colonias viables mediante el método de siembra por superficie en placas de agar selectivo. Las colonias se contaron después de una incubación nocturna a 37°C. A partir de aquí se determinó la concentración a utilizar para realizar la extracción del ADN de las muestras.

Otros investigadores también han estandarizado la detección de patógenos en alimentos por mPCR utilizando el ADN extraído de alícuotas de recuperación de co-cultivo de matrices alimentarias inoculadas artificialmente. Boukharouba y col., reportaron en el año 2022 la recuperación de 4 patógenos *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Salmonella enterica* (*S. enterica*) en hojas de lechuga y carne picada,

de acuerdo con las condiciones optimizadas mencionadas anteriormente. Por su parte, Chen y col., en 2022, reportaron que los límites de detección de *Salmonella*, *E. coli* y *S. aureus* en medio puro fueron de 100, 100 y 10 UFC/mL, respectivamente, lo que permite utilizar este método en el monitoreo de la contaminación microbiana en medicamentos y alimentos.

Con respecto a la estandarización de las condiciones de reacción de la PCR múltiple, luego de evaluar varias condiciones, se determinó que la temperatura de hibridación óptima para la combinación de primers utilizada es de 59°C, con lo cual se pudo observar las bandas de los microorganismos de interés.

Como ha sido descrito por Li y col., en 2022, la disminución en la especificidad de amplificación puede deberse a una baja temperatura de hibridación, por el contrario, en una PCR múltiple, un incremento en la temperatura de annealing (temperatura de hibridación), pudiera evitar que se observen algunas bandas. La temperatura de alineamiento es la temperatura a la cual los primers se unen con el ADN plantilla. La temperatura de alineamiento es la temperatura a la cual el primer se hibridiza al ADN template. Li y col. (2017), luego de probar temperaturas de hibridación desde 48 hasta 68°C, sugieren que el brillo de las bandas observadas en la PCR múltiple depende de la temperatura de hibridación. Li y col. (2017), en un estudio de PCR multiplex para la determinación de los microorganismos *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii*, *S. flexneri*, *P. putida*, *V. vulnificus*, and *V. alginolyticus*, reportaron que mejoraron el brillo de las bandas modificando las concentraciones de los primers.

En el presente trabajo, la eficiencia de amplificación para la detección de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y de *S. aureus*, se mejoró ajustando la concentración de los cebadores, quedando 1 μ M para *E. coli*, 0,5 μ M para *S. aureus* y 0,25 μ M para *Listeria monocytogenes*, con el fin de equilibrar eficazmente la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores y el brillo de las bandas.

Recomendaciones

Se recomienda continuar con la estandarización del PCR multiple que permita la detección simultánea de los patógenos *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* en queso blanco fresco. Se sugiere incluir más patógenos (Tao y col., 2020) para detectar en una misma mezcla de reacción, lo cual permitirá prevenir enfermedades transmitidas por alimentos y proteger la salud de la población de manera más eficiente.

Referencias Bibliográficas

- Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. 2020. Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *J Trop Med* 2020:4674235.
- Aladhadh M. 2023. A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms* 11(5):1111.
- Anklam KS, Kanankege KS, Gonzales TK, Kaspar CW, Döpfer D. 2012. Rapid and reliable detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time multiplex PCR. *J Food Prot* 75(4):643-650.
- Bendary MM, Abd El-Hamid MI, El-Tarabili RM, Hefny AA, Algendy RM, Elzohairy NA, Ghoneim MM, Al-Sanea MM, Nahari MH, Moustafa WH. 2022. *Clostridium perfringens* Associated with Foodborne Infections of Animal Origins: Insights into Prevalence, Antimicrobial Resistance, Toxin Genes Profiles, and Toxinotypes. *Biology (Basel)* 11(4):551.

- Bintsis T. 2017. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol* 3(3):529-563.
- Boukharouba A, González A, García-Ferrús M, Ferrús MA, Botella S. 2022. Simultaneous Detection of Four Main Foodborne Pathogens in Ready-to-Eat Food by Using a Simple and Rapid Multiplex PCR (mPCR) Assay. *Int J Environ Res Public Health* 19(3):1031.
- Chapela MJ, Garrido-Maestu A, Cabado AG. 2015. Detection of foodborne pathogens by qPCR: A practical approach for food industry applications, *Cogent Food & Agriculture* 1:1,
- Chen Y, Wang Z, Shi Q, Huang S, Yu T, Zhang L, Yang H. 2021. Multiplex PCR method for simultaneous detection of five pathogenic bacteria closely related to foodborne diseases. *3 Biotech* 11(5):219.
- Chen M, Lan X, Zhu L, Ru P, Xu W, Liu H. 2022. PCR Mediated Nucleic Acid Molecular Recognition Technology for Detection of Viable and Dead Foodborne Pathogens. *Foods (Basel, Switzerland)* 11(17): 2675.
- Chlebicz A, Śliżewska K. 2018. *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review*. *Int J Environ Res Public Health* 15(5):863.
- Comisión Venezolana De Normas Industriales (COVENIN) 3821-2003. Queso blanco. Fondonorma. Caracas, Venezuela. 8 p.
- Comisión Venezolana De Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 1126-89. Alimentos. Identificación y preparación de muestra para análisis microbiológico. 1a Rev. 7 pp. 198.
- Fetsch A. 2018. *Staphylococcus aureus*. London: Academic Press.
- Fox EM, Bierne H, Stessl B. 2021. *Listeria monocytogenes*. Methods and Protocols. New York: Humana Press.
- Fung F, Wang HS, Menon S. 2018. Food safety in the 21st century. *Biomed J* 41(2):88-95.
- Gao S, Liu J, Li Z, Ma Y, Wang J. 2021a. Sensitive detection of foodborne pathogens based on CRISPR-Cas13a. *J Food Sci* 86(6):2615-2625.
- Gao R, Liao X, Zhao X, Liu D, Ding T. 2021b. The diagnostic tools for viable but nonculturable pathogens in the food industry: Current status and future prospects. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20(2):2146-2175.
- Hu L. 2019. Food Safety Rapid Detection and Effective Prevention of Foodborne Hazards. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hu L, Deng X, Brown EW, Hammack TS, Ma LM, Zhang G. 2018. Evaluation of Roka Atlas *Salmonella* method for the detection of *Salmonella* in egg products in comparison with culture method, real-time PCR and isothermal amplification assays. *Food Control* 94:123-131.
- Infante G. 2020. Invelear: «El 50% de los hogares venezolanos consume queso blanco duro llanero». Fedecamaras Radio. Retrieved March 20th, 2024, from: <https://fedecamarasradio.com/queso-blanco-esta-en-el-50-de-los-hogares-venezolanos/>
- Li B, Liu H, Wang W. 2017. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. *BMC Microbiol* 17(1):215.
- Li P, Feng X, Chen B, Wang X, Liang Z, Wang L. 2022. The Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria in Seafood Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction System. *Foods* 11(23):3909.
- Liu Y, Cao Y, Wang T, Dong Q, Li J, Niu C. 2019. Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Front Microbiol* 10:222.
- Liu S, Wang B, Sui Z, Wang Z, Li L, Zhen X, Zhao W, Zhou G. 2021. Faster Detection of *Staphylococcus aureus* in Milk and Milk Powder by Flow Cytometry. *Foodborne Pathog Dis* 18(5):346-353.
- Lopes ATS, Maciel BM. 2019. Real-Time Quantitative PCR as a Tool for Monitoring Microbiological Quality of Food. In: Nagpal ML, Boldura O, Baltă C, Enany S, editors. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science (Internet)*. London: IntechOpen.
- Lv R, Wang K, Feng J, Heeney DD, Liu D, Lu X. 2020. Detection and Quantification of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Front Microbiol* 10:2920.
- Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M. 2019. Multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodborne pathogens in raw milk. *J Appl Microbiol* 127(1):262-273.
- Ou A, Wang K, Ye Y, Chen L, Gong X, Qian L, Liu J. 2021. Direct Detection of Viable but Non-culturable (VBNC) *Salmonella* in Real Food System by a Rapid and Accurate PMA-CPA Technique. *Front Microbiol* 12:634555.
- Parichehr M, Mohammad K, Abbas D, Mehdi K. 2019. Developing a multiplex real-time PCR with a new

- pre-enrichment to simultaneously detect four foodborne bacteria in milk. *Future Microbiol* 14:885-898.
- Patel IR, Gangiredla J, Lacher DW, Mammel MK, Jackson SA, Lampel KA, Elkins CA. 2016. FDA *Escherichia coli* Identification (FDA-ECID) microarray: a pangenome molecular toolbox for serotyping, virulence profiling, molecular epidemiology, and phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 82(11):3384-3394.
- Rahman MM, Lim SJ, Park YC. 2022. Development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Based Triplex PCR Marker for Serotype-specific *Escherichia coli* Detection. *Pathogens* 11(2):115.
- Rao S, Arora K. 2020. Recent trends in molecular techniques for food pathogen detection, In: *Chemical Analysis of Food (Second Edition)*, Editor(s): Yolanda Pico, Academic Press, 177-285.
- Shin J, Miller M, Wang YC. 2022. Recent advances in CRISPR-based systems for the detection of foodborne pathogens. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 21(3):3010-3029.
- Stingl K, Heise J, Thieck M, Wulsten IF, Pacholewicz E, Iwobi AN, Govindaswamy J, Zeller-Péronnet V, Scheuring S, Luu HQ, Fridriksdottir V, Gözl G, Priller F, Gruntar I, Jorgensen F, Koene M, Kovac J, Lick S, Réperant E, Rohlfing A, Zawilak-Pawlik A, Rossow M, Schlierf A, Frost K, Simon K, Uhlig S, Huber I. 2021. Challenging the “gold standard” of colony-forming units - Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses. *Int J Food Microbiol* 359:109417.
- Tao J, Liu W, Ding W, Han R, Shen Q, Xia Y, Zhang Y, Sun W. 2020. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens. *J Food Sci* 85(3):744-754.
- Xiong D, Zhou Y, Song L, Liu B, Matchawe C, Chen X, Pelle R, Jiao X, Pan Z. 2022. Development of a Duplex TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction for Accurate Identification and Quantification of *Salmonella* Enteritidis from Laboratory Samples and Contaminated Chicken Eggs. *Foods* 11(5):742.
- Yoon J-H, Wei S, Oh D-H. 2018. A highly selective enrichment broth combined with real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples. *LWT-Food Sci Technol* 94:103-110.
- Zhong J, Zhao X. 2018. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 by PCR in combination with propidium monoazide. *3 Biotech* 8(1):28.