

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 EN BUTIFARRAS[†].

Nadian Daniela Caro Olivera¹, Eddie José Luquez Zambrano¹, Zamira Soto Varela^{2*},
Liliana Pérez Lavalle².

¹ Estudiante programa de Microbiología, Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar.

² M.Sc. Profesor investigador programa de Microbiología, Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Grupo Bio-organizaciones. Universidad Simón Bolívar.

*Correspondencia: zsoto1@unisimonbolivar.edu.co

Resumen.

Los productos cárnicos se consideran una de las fuentes potenciales de transmisión de la cepa enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 la cual ha sido asociada a colitis hemorrágica y al síndrome hemolítico-urémico (SHU) pudiendo llegar a causar la muerte. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo estandarizar la técnica de PCR múltiple, para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 en butifarras de Soledad, Atlántico. Para el cumplimiento de este objetivo, se compararon los protocolos propuestos por dos artículos: Desmachellier (1998) para la amplificación del gen *rfbE* que codifica para la perosamina sintasa y el de Gannon (1997) para la amplificación del gen *fliC* que codifica para la proteína flagelina. Se llevaron a cabo 8 ensayos, durante los cuales se modificaron variables, tales como las concentraciones del MgCl₂ y la enzima Taq polimerasa y la temperatura de hibridación, los cuales influyen significativamente en las amplificaciones de los genes de interés. Una vez estandarizadas y optimizadas, estas fueron evaluadas en un ensayo piloto usando ADN extraído de 17 muestras de butifarras provenientes de microempresas del municipio de Soledad, las cuales fueron seleccionadas por un alto recuento de *E. coli*. Las condiciones estandarizadas para la PCR múltiple fueron: 2,0 U de enzima, 2mM de MgCl₂ y una temperatura de hibridación de 62,6 °C. Los resultados del ensayo piloto mostraron una amplificación del 95% para el gen *fliC* y del 24% para el gen *rfbE* y se obtuvo un total del 17% para la amplificación de ambos genes, lo que representa la presencia de este serotipo en este producto cárnico, demostrando las malas prácticas de manufactura.

Palabras Claves: Polymerase Chain Reaction, *Escherichia coli*, carne (Fuente: Decs).

[†] Este trabajo es parte de los resultados del proyecto “Estudio higiénico-sanitario de microempresas productoras de butifarra ubicadas en la zona centro del municipio de Soledad, Atlántico” del programa de Microbiología”.



Referencias bibliográficas.

1. Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico [Internet]. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. 2009. 18-109 p. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
2. GFN W. Diagnóstico de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. por PCR Inversión de fase en *Salmonella* spp. Inst Nac enfermedades Infecc. 2010;
3. SIVIGILA. [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co>
4. OPS. OPS [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.paho.org/col/>
5. FAO. *Escherichia coli*. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales [Internet]. 2011;39. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>
6. OMS. Inocuidad de los alimentos [Internet]. OMS. 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
7. Pelcastre N, Quiñónez E, Vázquez C. Enfermedad de las hamburguesas *Escherichia Coli* O157:H7. Revista Digital Universitaria. 2004; 5(7).
8. Mattar S, Visbal J. *E. coli* O157:H7 Enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en Colombia. MVZ-Córdoba. 200;6(2):81–6.
9. Anaya PAF, Medina LMR, Ugarriza MEO, Gutiérrez LAL. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. Rev Lasallista Investig. 2013;10(1):91–100.
10. Instituto colombiano de normas técnicas y certificación (ICONTEC). NTC 1325. Bogotá D.C. 2008;1–12.
11. Brusa V. Desarrollo y validación intralaboratorio de una metodología para la detección y aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en carne bovina molida. Desarrollo de estrategias de control. [Internet]. Clinical Microbiology Reviews. Universidad Nacional de La Plata.; 2015. Disponible en: <http://espanol.foodsafety.gov/intoxicación/causas/bacteriasvirus/ecoli/x3p/índice.html>
12. Lombard B, Leclercq A. Validation of Innovative Food Microbiological Methods According to the EN ISO 16140 Standard. Food Analytical Methods[Internet] 2010; (4): 163-172 [consultado 2018-03-22]. Disponible en: <http://Scientific T, Products M. Making food safer according to ISO methods. 2013;1–55.>
13. Giorgio EM, Chaneton BJ, Zapata PD. Optimización de la amplificación mediante PCR de la región promotora 1 del gen *shp-1* luego de su tratamiento con bisulfit. Rev Cienc y Tecnol. 2011;12:4–8.
14. Campo-portacio DM, Discuviche-rebolledo MA, Blanco-tuirán PJ, Montero-Pérez YM, Estela K, Yulenis O. Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen B1 en

- carnes de consumo humano. Rev Esp) /ntilde glyphshow (ola Cirugía Ortopédica y Traumatol Neurol [Internet]. SECOT; 2014;18(3):93–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.05.001>
15. Reyes J, Viettri M, Rivas A, Lares M, Herrera L, Cma Y. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de *Leishmania* sp. en muestras de sangre de caninos Standardization. Rev la Fac ciencias Vet. 2015;56(2):67–74.
16. Bolivar AM, Rojas A, Garcia-lugo P. PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol). Avan Biomed. 2014;3(1):25–33.
17. Grupo de Vigilancia y control de factores de riesgo ambiental. Protocolo de Vigilancia y Control de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Inst Nac salud [Internet]. 2011;0:30. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ETA.pdf>
18. Márquez-Sagrero T. Universidad veracruzana. Vol. 1, Tesis. 2014.
19. Badui D. Química de los alimentos [Internet]. Ed. Pearson educación. 2006. 736 p. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LIBROSNL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=004719>
20. Salas A, Corro A. La butifarra soledena es una tradición gastronómica de Colombia. cháchara [Internet]. 2016; Disponible en: <http://lachachara.org/2016/11/la-butifarra-soledena-es-una-tradicion-gastronomica-de-colombia/>
21. Soto Z, Pérez L, Estrada A D. Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at colombia. Salud Uninorte [Internet]. 2016;32(1):105–22.
22. Tabashsum Z, Nazneen M. Influence of Detection Methods in Characterizing *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Goat Meat Using Conventional and Molecular Methods. Biocontrol Sci. 2016;21(4):4–7.
23. Nacional U de tierra del fuego. Aplicación de la técnica molecular PCR multiplex para la identificación de especies de peces y uso de secuenciación masiva de ADN para el mejoramiento genético en acuicultura. 2007. p. 7–25.
24. Secretaria de salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. 2015;
25. Garcia-Rojo M, Morillo-Castro A. Tecnicas de Biología molecular en el diagnóstico en dermatología. dermatología Peru. 1999;9:1–72.
26. Campos Cae. Infecciones por *Escherichia coli* - Recursos en Bacteriología - UNAM [Internet]. 2015. p. 1–8. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
27. Camargo Y, Boom C. patogenicidad de *E. coli*. 2008. p. 1–7.

28. Bvs. RTV-*Escherichia coli* O157_H7. 9 Octubre 15. 2015.
29. EBMT. Una guía práctica para enfermeras y otros profesionales de la salud. 2010. p. 1–36.
30. Tapia C, Mishell J. “ Incidencia de cepas productoras BLEE y su resistencia bacteriana en pacientes de Nefrología , Transplante Renal y Urología del Hospital Carlos Andrade Marín en el periodo Julio 2015 – Diciembre 2015 .” central de ecuador; 2016.
31. Wa State University. *E. Coli* enterohemorrágica. 2010. p. 1–12.
32. Internacional R. Brote de *Escherichia coli* O157 : H7 en espinacas. OMS / FAO. 2007;(1):1–5.
33. CDC centro para el control y la prevención de enfermedades. Informes de algunas investigaciones de brotes epidémicos de *E. coli* [Internet]. página web del CDC. 2017. p. 1. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>
34. Zelaya J, Araujo Ah, Santos Rav. Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas de leche entera y pasteurizada comercializada en diferentes lugares de la ciudad de san miguel. universidad de el salvador; 2010.
35. CDC centro para el control y prevencion de enfermedades. Informes de algunas investigaciones de brotes epidémicos de *E. coli* [Internet]. 2017. p. 1. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>
36. Annual reviews.org [Internet]. Lipopolysaccharide Endotoxins | Annual Review of Biochemistry. Julio 2002. Disponible en <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
37. Cook P. GDP-Perosamine Synthase: Structural Analysis and Production of a Novel Trideoxysugar†,‡. *Biochemistry* 2008;47: 2833-2840[consultado 2018-03-22].
38. Guangfu Y, Jianjun N, Mingshan S, et al. Detection of *Escherichia coli* O157 using equal-length double-stranded fluorescence probe in a real-time polymerase chain reaction assay. *Clinica Chimica Acta*[Internet]2006; 366: 281-286 [consultado 2018-03-22].
39. Bilge S, Vary J, Dowell S, Tarr P. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Iai.asm.org*. 1996;64(11):4795–801.
40. NCBI. *fliC* proteína estructural del filamento flagelar. NCBI. 2017.
41. Olguín Y, Carrascosa L.G, Lechuga L.M, Young M, et al. The effects of lipids and surfactants on TLR5-proteoliposome functionality for flagellin detection using surface plasmon resonance biosensing. *Talanta* [Talanta]2014; 126: 136-144 [consultado 2018-03-22].
42. Duan Q, Zhou M, Liang H, Zhu X, Gluo Z, Li Y, et al. Contribution of flagellin subunit FliC to piglet epithelial cells invasion by F18ab *E. coli*. *Veterinary Microbiology* [Internet]2013;166(1–2):220–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.030>

43. Mahajan A, Currie CG, Mackie S, Tree J, Mcateer S, Mckendrick I, et al. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cellular Microbiology* [Internet] 2009; 11: 121-137 [consultado 2018-03-22].
44. Berkenpas E, Millard P, Pereira da Cunha M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensors. *Biosensors and Bioelectronics*[Internet].2006; 21: 2255-2262.
45. Rodríguez Sánchez IP, Barrera Saldaña HA. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Cienc UANL* [Internet]. 2004;VII:323–35. Available from: <http://eprints.uanl.mx/1584/>
46. Evelyn L, Patiño G, Alicxy N, Lizbeth SE, Acevedo N, Merari E, et al. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). México; 1985.
47. Tmay de Dios, Ibarra C, Velasquila C. Fundamentos de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnol en salud*. 2013;2(2):70–8.
48. Herraiz A. Biología molecular e ingeniería genética [Internet]. 2nd ed. elsevier health sciences; 2012. 203 p. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=EhDsL63ywX0C&dq=etapas+de+la+pcr&source=gs_navlinks_s
49. OMS. Enterobacterias S. III Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO- GFN). 2010.
50. Arredondo-peter R. Reaccion en la cadena de la polimerasa.pdf. mex: instuto de fisiologia celular UNAM; p. 70–242.
- 51.Áfido EDEL. Diversidad Genética En Poblaciones Remanentes De. *scielo*. 2013;1(1):123–35.
- 52.Wicht B, Yanagida T, Scholz T, Ito A, Jimenez J, Brabec J. Multiplex PCR for Differential Identification of Broad Tapeworms (Cestoda: Diphyllbothrium) Infecting Humans. *Journal of Clinical Microbiology*[Internet]2010; 48: 3111-3116.
53. Fernández ÁL, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González-Juanatey JR, et al. Evaluación de una PCR multiplex en tiempo real para la detección de patógenos en el tejido valvular de pacientes con endocarditis. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(10):1205–8.
54. Yue F, Cui S, Zhang C, Yoon K. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. 2012;10(3):273–9.
55. Guiarte L, suoza V, Aguirre X. Guía practica sobre la técnica de PCR. In: *ecologia molecular*. 2007. p. 520–36.
56. Rayaguru K, Routray W. Mathematical modeling of thin layer drying kinetics of stone apple slices. *Int Food Res J*. 2012; 19:1503–10.



57. Carolina Palomino-Camargo^{1, a, b}, Yuniesky González-Muñoz^{1, 2} C. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. 2009. p. 1–17.
58. Gallegos M, Morales A, Alvarez G, Vasquez J, Morales L, et al. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. 2008;19(2).
59. Desmarchelier P, Bilge S, Fegan N, Mills L, Vary J, Tarr P. A PCR Specific for *Escherichia coli* O157 Based on the rfb Locus Encoding O157 Lipopolysaccharide. Jcm.asm.org. 1998;36(6):1801–4.
60. Gannon V, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 1997;35(3):656–62.
61. Reyna A, Treviño V. Viana Tijerina, Espinoza Arturo. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne fresca de res mediante PCR múltiplex. Rev salud pública y Nutr. 2009;10.
62. Acosta L, Carillo, W, Muñoz, Carmen. Evaluación de la calidad microbiológica de unidades productoras de butifarras en Soledad Atlántico. 2015. Disponible en: <http://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/123456789/1512/Evaluaci%C3%B3n%20de%20calidad%20microbiologica%20unidades%20de%20butifarras%20%28Liliana%20Perez%20%20Zamira%20Soto%29%20OK.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Blanco A, Peralta P. Competitividad y estructura organizacional de las PYMES del sector alimento en Barranquilla. Una perspectiva conceptual. Desarrollo Gerencial. 2015;7(2) <https://doi.org/10.17081/dege.7.2.1187>