

Optimización de temperatura de anillamiento de PCR multiplex para la detección de *Listeria monocytogenes*

Multiplex PCR annealing temperature optimization for the detection of *Listeria monocytogenes*

Luis Barboza-Fallas¹, Rossy Guillén-Watson², Olga Rivas-Solano³,
Johnny Peraza-Moraga¹

Barboza-Fallas, L; Guillén-Watson, R; Rivas-Solano, O; Peraza-Moraga, J. Optimización de temperatura de anillamiento de PCR multiplex para la detección de *Listeria monocytogenes*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32 Especial. Marzo 2019. Pág 37-42.

DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v32i5.4170>



- 1 Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
- 2 Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: roguillen@tec.ac.cr
- 3 Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: orivas@tec.ac.cr
- 4 Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: jperaza@gmail.com



Palabras clave

PCR multiplex; *Listeria monocytogenes*; bacteria patógena; serotipos.

Resumen

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular oportunista que se ha convertido en una de las causas más importantes de infecciones transmitidas por alimentos en todo el mundo. Debido a la relevancia de *L. monocytogenes* en la salud pública se han descrito muchos protocolos para la identificación y tipificación de este organismo, pero en su mayoría son muy complejos y de larga duración. Por esta razón, se desarrolló un PCR multiplex, para la detección rápida y sensible de esta bacteria en diferentes tipos de muestras. El objetivo del presente estudio fue optimizar la técnica de PCR multiplex para la identificación de *L. monocytogenes*. Se probaron distintas temperaturas de anillamiento para determinar cuál presentaba mayor especificidad, evitando las amplificaciones inespecíficas. Se obtuvo amplificaciones a 57°C y temperaturas menores. Se concluye que la mejor temperatura para t_m es la de 57°C.

Keywords

Multiplex PCR; *Listeria monocytogenes*; pathogenic bacteria; serotypes.

Abstract

Listeria monocytogenes is an opportunistic intracellular pathogen. It is one of the most important causes of foodborne infections worldwide. Due to the importance of *L. monocytogenes* in public health many protocols for the identification and typing of this organism have been described, but most of them are very complex and long lasting. For this reason, a multiplex PCR was developed for the rapid and sensitive detection of this bacterium in different types of samples. The objective of the present study was to optimize the multiplex PCR technique for the identification of *L. monocytogenes*. Different annealing temperatures were tested to determine which has the highest specificity, avoiding nonspecific amplifications. Amplifications were obtained at 57 ° C and lower temperatures. It is concluded that the best temperature for t_m is 57 ° C.

Introducción

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo que puede causar enfermedades graves como listeriosis en personas con condiciones inmunocomprometidas específicas, mujeres embarazadas, recién nacidos y ancianos [1]. Actualmente la listeriosis sigue generando preocupación en la población mundial debido a su elevada tasa de mortalidad la cual se encuentra entre un 20% a un 30% [2]. Un censo realizado en el 2010 reveló que la listeriosis es responsable de 23,150 enfermedades, 5463 muertes y 172,823 años de vida ajustados por discapacidad a nivel mundial [3].

Para la industria alimentaria *L. monocytogenes* es uno de los desafíos más serios e importantes. La naturaleza ubicua de esta bacteria, junto con su capacidad para crecer a bajas temperaturas, hacen de esta una gran amenaza para la seguridad alimentaria [4]. Se ha reportado que, en alimentos de origen casero, artesanal y en ferias del agricultor, el porcentaje de productos con *Listeria spp.* es alto, debido a la falta de controles de calidad y manipulación de los alimentos. Este hecho evidencia que en Costa Rica existe un alto riesgo de contraer alguna enfermedad provocada por la exposición a alimentos o ambientes con presencia de *L. monocytogenes* [5].

Debido al alto riesgo que representa *L. monocytogenes* alrededor del mundo, es de gran importancia desarrollar un método preciso, económico, rápido y de alto rendimiento para su identificación y su linaje, esto con el objetivo de comprender la genética de poblaciones, ecología y epidemiología de este patógeno [1]. Por esta razón contar con un PCR multiplex altamente específico de *L. monocytogenes* provocaría un serotipado menos costoso y más eficiente [6].

Entre los 13 serotipos conocidos de *L. monocytogenes*, los serotipos 1/2a y 4b representan los principales causantes de los brotes de listeriosis ya que, todos los clones epidémicos identificados pertenecen a estos dos serotipos. Para ambos, 1/2a y 4b, se diseñaron imprimadores en marcadores específicos (lmo0737 y ORF2110, respectivamente), identificados en un estudio de microarreglos [7]. El gen marcador lmo1118 se encuentra identificado en el serotipo *L. monocytogenes* 1/2a cepa EDGe y el gen ORF2819 se identificó en la cepa CLIP 80459 de *L. monocytogenes* 4b. El gen *prs*, es específico para las cepas del género *Listeria*, era dirigido para un control de amplificación interno [8].

Desde el año 2015, en el Tecnológico de Costa Rica, se han realizado distintas investigaciones relacionadas a la detección de *Listeria spp* en Costa Rica. Un resultado de estos proyectos fue el descubrimiento de una nueva especie a la cual se le nombró *Listeria costaricensis* [9]. Estos proyectos han sido financiados por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) y ha contado con la participación de Investigadores de las Escuelas de Biología y Química, además, del apoyo del Instituto Pasteur en Francia.

El objetivo principal de este trabajo fue optimizar la técnica de PCR multiplex para la identificación de los distintos serotipos de *L. monocytogenes*.

Materiales y métodos.

Crecimiento de las cepas utilizadas.

Para esta investigación se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* y *L. innocua* aisladas e identificadas en el Laboratorio de Bacteriología, TEC y *Escherichia coli* DH5-*alpha*. Cada una de las bacterias se cultivaron en tubos cónicos que contenían medio BHI (Oxoid) crecidas por 24 horas a 37°C.

Extracción de ADN.

Se tomó cada uno de los tubos cónicos que contenían las células bacterianas y se centrifugaron a 10 000 gravedades por 5 minutos. Seguidamente se descartó el sobrenadante y se almacenó el *pellet* a -20°C. La extracción de ADN para cada una de las cepas se realizó siguiendo el protocolo de UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mo BIO). El ADN extraído se cuantificó en el NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific), para conocer su pureza y concentración y seguidamente se almacenó a -20°C.

Optimización de PCR Multiplex.

Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de 250 µl, con un volumen final de 25 µl que contenía 1 U de *DreamTaq DNA Polymerase*, 3 µl de 10X *DreamTaq* Buffer, 0.4 mM dNTP's. Los cinco cebadores utilizados se añadieron con las siguientes concentraciones: 1µM para lmo0737, ORF2819 y ORF2110; 1,5 µM para lmo1118; y 0,2 µ M para *prs* (cuadro 1). El perfil utilizado para el PCR fue el siguiente: 94°C durante 5 min como paso inicial, 40 ciclos de 94°C por 0.40 min, se probó el siguiente gradiente de temperaturas: 49°C, 51°C, 53°C, 55°C, 57°C y 59°C por 1.15min y 72°C durante 1.15min y un ciclo final a 72°C por 5 min.



Visualización de los Productos de PCR

Para observar los resultados del PCR, se mezcló 8 μ l de muestra con 3 μ l de buffer carga más gel red (Biotium) y se corrió en un gel de agarosa al 2% por 2 horas a 60V.

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores utilizados en este estudio

Gen	Secuencias de cebadores (5'-3') ^a	Tamaño de producto	Serotipo
prs	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	Todas las especies de <i>Listeria</i>
ORF2819	For: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	<i>L. monocytogenes</i> serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, and 4e
ORF2110	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	<i>L. monocytogenes</i> serotipos 4b, 4d, and 4e
<i>lmo0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	<i>L. monocytogenes</i> serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, and 3c
<i>lmo1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCCGCATACTTA	906	<i>L. monocytogenes</i> serotipos 1/2c and 3c

^a For, forward; Rev, reverse.

Fuente: Modificado de [10]

Resultados y discusión

En la figura 1 se muestra el resultado del PCR multiplex con gradiente de temperatura, realizado a las cepas de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *E. coli*. Como se puede apreciar en la figura 1, para el caso de la cepa de *L. monocytogenes* se obtuvo amplificaciones en todas las temperaturas de T_m (Primer Melting Temperature) probadas. Para el caso de la cepa de *L. innocua* a partir de los 59°C de t_m ya no amplifica el fragmento deseado. Por otra parte, la cepa de *E. coli*, no mostró ninguna amplificación a ninguna temperatura.

De acuerdo con Lievens *et al.* [11], disminuir la temperatura de t_m o anillamiento afecta la especificidad del método de PCR, por lo cual se deben realizar controles adicionales para confirmar que las nuevas condiciones de reacción no dan como resultado una amplificación inespecífica. La temperatura de anillamiento reportada en artículos previos para estos imprimadores era de 53°C [10], pero en este estudio se comprobó que puede ser mayor, para evitar amplificaciones inespecíficas.

MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

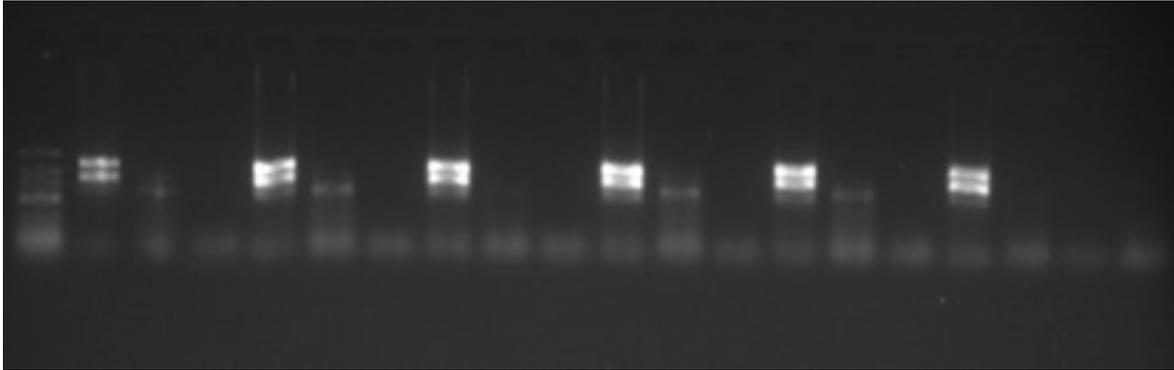


Figura 1. Gel de Agarosa al 2% m/v con los fragmentos de ADN generados por el PCR multiplex. 1: *L. monocytogenes*, 2: *L. innocua* 3: *E. coli* con una tm de 49°C. 4: *L. monocytogenes*, 5: *L. innocua* 6: *E. coli* con una tm de 51°C. 7: *L. monocytogenes*, 8: *L. innocua* 9: *E. coli* con una tm de 53°C. 10: *L. monocytogenes*, 11: *L. innocua*, 12: *E. coli* con una tm de 55°C. 13: *L. monocytogenes*, 14: *L. innocua*, 15: *E. coli* con una tm de 57°C. 16: *L. monocytogenes*, 17: *L. innocua*, 18: *E. coli* con una tm de 59°C.

Actualmente, en el Tecnológico de Costa Rica se continúa realizando investigaciones sobre la identificación de *Listeria monocytogenes* en distintos suelos del país. Estas investigaciones se encuentran financiadas por la VIE, además, se pretende dar continuidad a temas relacionados con esta bacteria, específicamente aislamientos e identificación. Para ello, contar con pruebas rápidas y precisas que identifiquen los serotipos de *L. monocytogenes* nos permitirá ahorrar costos y tiempo en los análisis.

Conclusiones y recomendaciones

Se recomienda utilizar como temperatura de anillamiento, para este tipo de PCR, 57°C, debido a que presentó bandas muy nítidas y al ser una temperatura alta se disminuyen las amplificaciones inespecíficas.

Por otra parte, si la concentración de ADN es baja, se recomienda la aplicación de 40 ciclos en el PCR para visualizar mejor los fragmentos amplificados.

Referencias

- [1] M. Doumith et al., «New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays», *Infect. Immun.*, vol. 72, n.o 2, pp. 1072–1083, 2004. <https://iaa.asm.org/content/72/2/1072.short>
- [2] P. S. Mead et al., «Food-related illness and death in the United States.», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 5, n.o 5, p. 607, 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627714/>
- [3] C. M. de Noordhout et al., «The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis», *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, n.o 11, pp. 1073–1082, 2014. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309914708709>
- [4] R. L. Buchanan, L. G. Gorris, M. M. Hayman, T. C. Jackson, y R. C. Whiting, «A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments», *Food Control*, vol. 75, pp. 1–13, 2017. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>
- [5] G. Kooper, G. Calderón, S. Schneider, W. Domínguez, y G. Gutiérrez, Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto económico. Estudio de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Roma. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN Roma, 2009. <https://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=MAGSV.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=004727>



- [6] J. D. Palumbo, M. K. Borucki, R. E. Mandrell, y L. Gorski, «Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, n.o 2, pp. 564–571, 2003. <https://jcm.asm.org/content/41/2/564.short>
- [7] Y. Chen y S. J. Knabel, «Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n.o 19, pp. 6299–6304, 2007. <https://aem.asm.org/content/73/19/6299.short>
- [8] L. Lotfollahi, A. Chaharbaresh, M. A. Rezaee, y A. Hasani, «Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran», *Microb. Pathog.*, vol. 107, pp. 425–429, 2017. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401016305617>
- [9] K. Núñez-Montero et al., «*Listeria costaricensis* sp. nov.», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>.
- [10] M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, y P. Martin, «Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, n.o 8, pp. 3819–3822, 2004. <https://jcm.asm.org/content/42/8/3819.short>
- [11] A. Lievens, S. Jacchia, D. Kagkli, C. Savini, y M. Querci, «Measuring digital PCR quality: performance parameters and their optimization», *PLoS One*, vol. 11, n.o 5, p. e0153317, 2016. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153317>