

Aplicación de la técnica PMA-qPCR para detectar viabilidad de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en hamburguesas de carne vacuna.

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

¹ Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA Castelar, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina
rey.angeles@inta.gov.ar

Introducción

El PMA (*propidium monoazide*) es un colorante fotoreactivo 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 intercalándose 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.

Objetivo

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

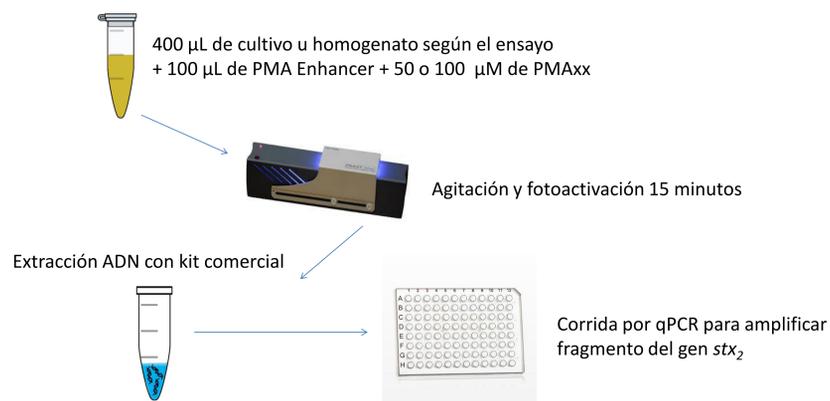
Inóculo

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). Se realizaron diluciones seriadas de ambos inóculos, con concentraciones finales de 7,6,5,4,3,2 y 1 log UFC/ml.

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%.

Tratamiento con PMA y qPCR



Diseño experimental

Se realizaron cuatro 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 7 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.

Resultados

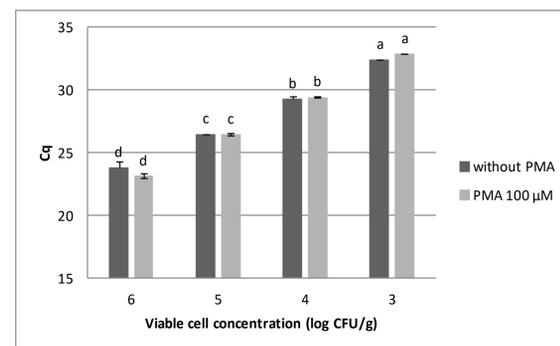
Ensayo 1

Tabla 1: Valores de Cq obtenidos en muestras con 4, 5 y 6 log UFC/ml de bacterias muertas inactivadas por calor tratadas y sin tratar con PMA

Concentración de células no viables (logUFC/ml)	Sin PMA	50 µM PMA	100 µM PMA
6	21,82 ± 0,191	28,32 ± 0,099	32,76 ± 0,082
5	25,58 ± 0,282	29,71 ± 0,028	indetectable
4	31,12 ± 0,289	33,38 ± 0,219	indetectable

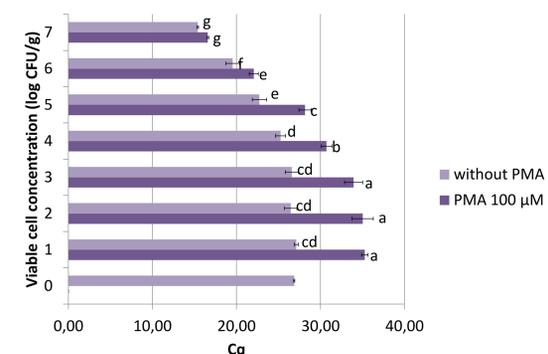
Ensayo 2

Gráfico 1: Valores de Cq obtenidos para muestras con 3, 4, 5 y 6 log UFC/ml de células viables tratadas y sin tratar con PMA.



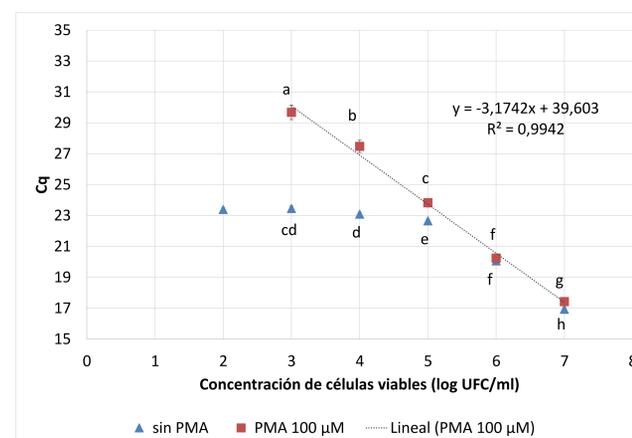
Ensayo 3

Gráfico 2: Valores de Cq para muestras de cultivo con mezclas de bacterias muertas en una única concentración (5 log UFC/ml) y concentraciones variables de bacterias viables. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.



Ensayo 4

Gráfico 3: Valores de Cq para muestras de hamburguesa de carne vacuna inoculadas con una misma concentración de bacterias muertas (5 log UFC/ml) y concentraciones variables de bacterias viables. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.



Conclusiones

- La amplificación del ADN de bacterias de STEC inactivadas por calor fue completamente inhibida con el tratamiento con PMA 100 µM.
- 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.

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.