

DETERMINACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE COMIDA RÁPIDA

DETERMINATION BY REAL TIME PCR OF *Escherichia coli* ON PUBLIC FAST FOOD

Viviana Chiluisa Utreras, Jorge Coba y Andrea Echeverría

Centro de Investigación y Valoración para la Biodiversidad CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito - Ecuador

Autor para correspondencia: vchiluisa@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 20 de agosto de 2013. Aceptado, tras revisión, el 22 de julio de 2014.

Resumen

En la presente investigación se analizaron muestras de alimentos expendidos en las calles aledañas a la Universidad Politécnica Salesiana, Sede El Girón y se determinó la presencia de *Escherichia coli* mediante la técnica de PCR en Tiempo Real con una comprobación microbiológica en tres establecimientos de comida rápida más concurridos por la comunidad de estudiantes de las Universidades cercanas. Para lograr un análisis estadístico confiable, se analizaron alrededor de 15 muestras de alimentos por cada uno de los establecimientos con diferentes productos. Se elaboró un protocolo para la cuantificación de las muestras, utilizando una curva estándar para *E. coli*. Los análisis microbiológicos se realizaron por un método estándar convencional por cultivo en medios específicos (EMB, McConkey) y la PCR en tiempo real con un diseño de primers específicos y el kit de LC FS DNA Master[®] PLUS HY-Pb, 96 react. (Roche Diagnostics). Con la PCR se aisló *E. coli* en el 100 % de las muestras, mientras que por el método convencional se detectó tan solo el 53,36 %. La prueba de χ^2 mostró significancia estadística entre ambas técnicas. El método molecular reveló un total de 100 % de casos positivos en los alimentos expendidos en los tres establecimientos de comida rápida que presentaron mayor contaminación por *E. coli*, mientras que a través del método convencional se obtuvieron en: hamburguesas 40 %, shawarmas 66,7 % y pinchos 53,3 % de casos positivos respectivamente. Se observó además diferencias con respecto al tiempo empleado por cada una de las técnicas: la PCR permite obtener resultados mucho más sensibles, rápidos y específicos, en comparación con el método convencional de cultivos celulares. Mediante la curva estándar se logró cuantificar la cantidad de ADN en cada muestra.

Palabras claves: *E. coli*, alimentos, técnicas, PCR en tiempo real, microbiología.

Abstract

Using Real Time PCR and microbiology methods we analyzed several food samples expended in streets around Universidad Politécnica Salesiana, Sede El Girón in search for the bacteria *Escherichia coli*. We selected three fast food restaurants, which were identified as the most important and popular for the community of students from nearby universities. To achieve a reliable statistical analysis were analyzed approximately 15 samples for each food establishment using different products. We developed a protocol for the quantification of samples, using a standard curve for *E. coli*. Microbiological analyzes were performed by a conventional standard method for cultivation in specific media (EMB, McConkey) and the real-time PCR with specific primers using the Kit FS LC DNA Master PLUS[®] HY-Pb, 96 react. (Roche Diagnostics). Through real time PCR we isolated *E. coli* in all the samples (100 % success), whereas using the conventional method we detected *E. coli* in only 53.36 % of the analyzed food. Chi-square (χ^2) test showed statistical significance between both techniques. The molecular technique revealed a 100 % of positive *E. coli* cases in the analyzed fast food in all three establishments, whereas through the conventional method we identified *E. coli* in: 40 % of the hamburger samples, 66.7 % of the shawarma samples and 53.3 % of the skewers. We also observed differences in the speed each technique requires to show results: real Time PCR is much more sensitive, rapid and specific compared to the conventional method of cell culture. We quantified the amount of DNA in each sample through a standard *E. coli* curve.

Keywords: *E. coli*, food, techniques, real-time PCR, microbiology.

Forma sugerida de citar: Chiluisa-Utreras V., J. Coba y A. Echeverría. 2014. **Determinación por PCR en Tiempo Real de *Escherichia coli* en muestras de comida rápida.** La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 19(1): 44-50. ISSN: 1390-3799.

1. Introducción

La *Escherichia coli* diarrogénica, es la principal causa de gastroenteritis para la población en los países subdesarrollados (Instituto Nacional de Salud, 2008). Este patógeno está asociado con altos niveles de resistencia a antibióticos, existen 6 categorías de la bacteria que están asociadas a diarreas, las cuales han sido clasificadas por sus características clínicas, epidemiológicas y por la presencia de proteínas específicas y genes de virulencia. En esta afección se ven involucrado además otros patógenos entéricos, como: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Vibrio cholerae* (Hannaoui *et al.*, 2010).

Las infecciones por *E. coli* pueden causar pequeños brotes en la población; entre el 60 % y 80 % de los casos son esporádicos; pero en ocasiones se producen grandes brotes en hospitales, escuelas, colegios, universidades y restaurantes. En Ecuador, en el año 2010, se registraron 14.887 casos, con una tasa de 127,3 por 100.000 habitantes, casi 50 % más que en 2005. Los productos alimenticios comúnmente asociados a los brotes son: pescados (22 %), agua (20 %) y carnes de ganado (14 %), sin dejar de lado también algunos tipos de frutas y verduras. Estudios previos realizados han reportado un 10.3 % de *E. coli*, en alimentos de ventas callejeras o de pequeños bares de habitual consumo de estudiantes (González y Rojas, 2005).

La vigilancia de los patógenos en todas las etapas en la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un instrumento clave en la investigación epidemiológica (Almeida, 2002). Los mercados internacionales, exigen para sus consumidores productos libres de patógenos alimenticios (Gálvez, 2011).

Para la prevención y el control de las enfermedades transmitidas por alimentos, muchos países, como Estados Unidos, Canadá, entre otros, tienen establecido dentro de su legislación "baja tolerancia" para los patógenos alimenticios, en función de esto, es necesario técnicas rápidas y modernas para la industria; por lo que la implementación de los métodos moleculares es necesaria, ya que las técnicas tradicionales toman días para la identificación y cuantificación de *E. coli* (Bustos, 1997).

La Biotecnología moderna presenta nuevos métodos alternativos, que muestran varias ventajas an-

te los métodos tradicionales, en cuanto a eficiencia, sensibilidad y rapidez (Barleta *et al.*, 2009). Estos métodos eficaces, por estar basados en biomoléculas del tipo ácidos nucleicos, tienden a ser muy específicos (Rojas y González, 2006). La técnica de PCR en Tiempo Real basada en la amplificación *in vitro* del ADN tiene la ventaja que lleva a cabo los procesos de detección y cuantificación en el mismo vial y en cada etapa de la reacción (Guion *et al.*, 2008).

La cuantificación de ADN bacteriano en las muestras obtenidas de alimentos, junto con la aplicación de metodologías de microbiología tradicional y un posterior análisis estadístico (Romo, 1973), ayudó a determinar si la presencia de estos microorganismos, se encuentran dentro de los rangos permitidos por el Instituto Ecuatoriano de Normalización RTE INEN 056:2011 mediante el ensayo especificado en la norma NTE INEN 1529-15. Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de los mismos (Codex Alimentarius).

La producción de alimentos inocuos genera la certeza de su procedencia y calidad sanitaria, sobre todo porque la comercialización de alimentos en la vía pública es un fenómeno de gran impacto social, sociocultural, socioeconómico y sanitario. En nuestro país, esta actividad es muy común en las ciudades principales, ya que ofrecen ciertas ventajas como: fácil acceso, bajo costo, variedad de alimentos y rapidez en su servicio; lo cual los convierte en una alternativa de consumo de alimentos en jóvenes en su mayoría en edad estudiantil, como parte de su dieta diaria o frecuente; el reducido espacio de los establecimientos donde se comercializan y el difícil acceso a servicios como agua y energía, complican el cumplimiento de las normativas sanitarias de inocuidad en los alimentos y manejo de los mismos, por lo que podrían llegar a convertirse en un vector de contaminación por microorganismos patógenos (Yáñez *et al.*, 2008).

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos y las enfermedades producidas por los mismos es uno de los problemas esenciales y crecientes en salud pública, por lo cual el surgimiento de nuevas herramientas moleculares permiten determinar tanto para la identificación como para la cuantificación de su material, los patógenos transmitidos a través de los alimentos mal preparados que son expendidos en la vía pública (Arola *et al.*, 2008).

2. Materiales y Métodos

2.1 Localización y tamaño de la muestra

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CI-VABI) de la Universidad Politécnica Salesiana Quito, Sede El Girón.

La determinación del número de muestras de alimentos se estableció mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia con los programas Statistix 8 e Infostat, utilizando la prueba de chi cuadrado χ^2 , para el análisis de la significancia de las diferencias encontradas en los métodos comparativos, donde el valor de la desviación estándar es igual a 0,05 correspondiente a un tamaño de muestra igual a 15 de cada alimento.

Estas muestras fueron tomadas en tres establecimientos de comida rápida en las calles cercanas a la UPS Quito en un periodo constante.

Por lo que, el tipo de alimento según el establecimiento se determinó con una pequeña encuesta y observación de las preferencias de los estudiantes universitarios cercanos al sector, los cuales fueron analizados por métodos de biología molecular y microbiología tradicional.

2.2 Recolección de Muestras Para Análisis

La recolección de las muestras de alimentos se realizó en base a La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-2:99 donde se encuentra definida la metodología de muestreo para alimentos de comida rápida.

Las muestras fueron tomadas con rapidez, en condiciones asépticas, de tal manera que fue representativa de la cantidad del alimento. En este caso, se tomaron muestras correspondientes a una unidad de producto que es expendida en el establecimiento de comida rápida (100 g. mínimo).

Posterior a esto, las muestras fueron enviadas al laboratorio de microbiología para realizar el tratamiento respectivo de conservación y mantenimiento, protegiéndola de cambios de temperatura, iluminación y manipulación para conservar su estado.

El almacenamiento, se lo realizó en conformidad con la misma norma (Chequeo de condiciones, etiquetado adecuado, temperatura de acuerdo al tipo

de alimento) para posteriormente realizar un enriquecimiento de las muestras en agua de peptona, lo cual permitió mantenerlas en condiciones estables tanto para el análisis molecular como el microbiológico.

2.3 Protocolo para la Determinación Microbiológica de *E. coli* en alimentos

Así mismo, esta metodología se la realizó conforme a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529.14:1998 (Control Microbiológico de Alimentos). Para esto, se llevó a cabo la preparación de los medios específicos para cultivo microbiológico de *E. coli* a partir de las muestras ya preparadas. Posteriormente, se realizaron las lecturas respectivas de las cajas de siembra y mediante análisis, metodologías bioquímicas y fenotípicas, determinando así, la presencia y concentración de la bacteria en los alimentos. Las pruebas principales de determinación son las Pruebas Bioquímicas de Identificación con su software de detección Microgen ID versión 1.2.

2.4 Aplicación de la Técnica de PCR en Tiempo Real

Para la aplicación de la técnica, se utilizó el equipo LightCycler® 2.0 de Roche; con los kits de purificación de ADN y amplificación en Tiempo Real.

En una primera parte del desarrollo de la técnica, se realizó la purificación de ADN, aplicando el Kit de Preparación de Muestras de Alta Pureza para PCR (High Pure PCR Template Preparation Kit).

Para la extracción del ADN se pesaron 25 g de cada muestra de alimento y se colocaron en 225 ml de agua con peptona, la cual se incubó a 37°C durante 24 horas. A partir de este, se transfirieron 200 μ l de cada muestra a los tubos de microcentrífuga, añadiendo el buffer de unión con la enzima y se transfirió a los tubos de purificación realizando varios lavados y filtraciones, se añadió el buffer de remoción de inhibidores y finalmente el buffer de elución. Se centrifugó el conjunto final por 1 minuto a 8000 rpm, con lo que se obtuvo el ácido nucleico que fue almacenado a 18°C para análisis posteriores.

Posterior a la purificación del ADN, se procedió a la aplicación de la técnica de PCR, para esto se tomaron 5 μ l del sobrenadante anterior, y se adicionó 10,2 μ l de Agua grado Biología Molecular, 0,4 μ l del

Primer FW, 0,4 μ l del Primer RW y 4 μ l del Master Mix (ya adicionada la enzima), en cada capilar con capacidad de 20 μ l con los que se ensambló el equipo para realizar la prueba del PCR en Tiempo Real, la mezcla del ADN y PCR mix se centrifuga a 3.000 rpm durante 3 segundos.

Los resultados de la amplificación se compararán con un control positivo representado por un estándar de *E. coli*, realizado en el laboratorio y un control negativo en el cual el ADN de la muestra será reemplazado por 5 μ l de agua estéril.

La técnica de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo según el protocolo de LC FS DNA Master⁺PLUS HY-Pb, 96 react. LightCycler (Roche Diagnostics), el cual consiste en 40 ciclos compuestos por cuatro pasos: Denaturación: 95°C, 10 min; Alineamiento: 62°C, 10sg; Melting: 95°C, 0; Enfriado: 4°C, 30sg.

2.5 Curva Estándar

Se realizó la Curva Estándar para cuantificar *E. coli*, utilizando muestras con concentraciones conocidas que fueron previamente cuantificadas con un espectrofotómetro y posteriormente con un Qubit. Los datos fueron incorporados al equipo, pudiéndose así cuantificar cada una de las reacciones y muestras.

3. Resultados

Se obtuvieron los puntos de la curva estándar a partir de las concentraciones obtenidas en el espectrofotómetro y el Qbit para poder realizar la cuantificación de las muestras analizadas.

De cada una de las muestras de alimentos analizadas en este estudio se logró determinar a través del método molecular un total de 100 % de casos positivos, mientras que a través del método convencional se obtuvieron en: hamburguesas 40 %, shawarmas 66.7 % y pinchos 53.3 % de casos positivos res-

pectivamente, en una población total de 45 muestras de alimentos.

Según la prueba estadística de Chi cuadrado χ^2 para analizar las frecuencias observadas de las esperadas, mediante el uso del programa SPSS; las técnicas utilizadas para determinar *Escherichia coli* en los alimentos mostraron un ($p = 0,0475$) y un valor de $\chi^2 = 1,491$ al 99 % por lo que se acepta la hipótesis, que se espera tener mayor número de casos de detección con la técnica Molecular en comparación con la técnica microbiológica.

El método convencional reveló un total de 53.36 % de casos positivos para *E. coli*, mientras que la técnica molecular mostró un total de 100 % de casos positivos; por lo que también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre los grupos para determinar la diferencia entre las técnicas, con ello se obtuvo un ($p = 0,000$) y un valor de $F = 8,56$, por lo que a su vez se efectuó una discriminación por medio del test de Duncan al 5 % obteniéndose dos grupos bien determinados que presentan diferencias significativas en cuanto a la presencia de *E.coli* en cada uno de los alimentos analizados; con lo que se concluye que hay diferencia entre las medidas, reportándose que las técnicas son diferentes y que visualizando los promedios se determina que el método molecular es más sensible y específico que el método convencional.

En la Figura 1 se observa la curva estándar con la que se trabajó la cuantificación de las diferentes muestras de alimentos, ésta presenta una eficiencia de 2 puntos y un error muy bajo de 0,025 que significa que los ensayos son certeros. En la Figura 2 se muestran algunas de las curvas obtenidas para la determinación: detección y cuantificación de *E. coli*, la fluorescencia es detectada desde el ciclo 25 con lo que se ratifica que se tiene una carga bacteriana importante ya que la relación de ciclos y carga es inversamente proporcional.

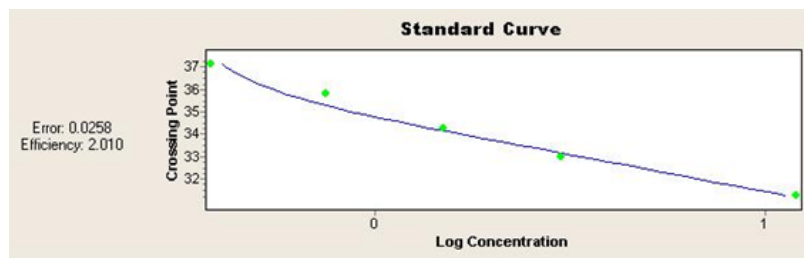


Figura 1. Curva Estándar obtenida para la cuantificación de *E. coli* en muestras de alimentos.

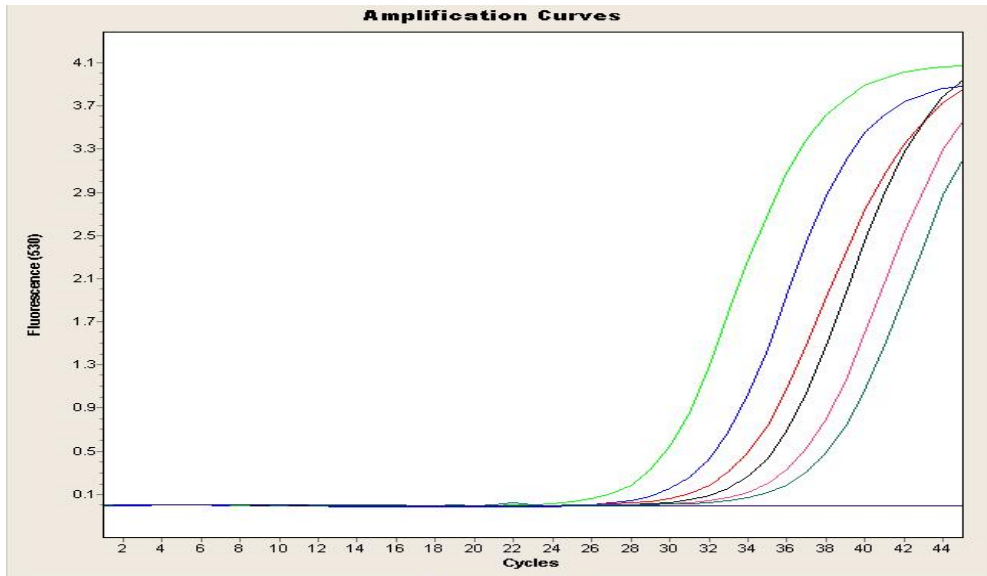


Figura 2. Curvas de Amplificación de *E.coli*: Fluorescencia vs ciclos.

Tabla 1. Casos positivos de *E.coli* por tipo de alimento y método utilizado.

Origen de las muestras	Muestras	N.	Método convencional		PCR en Tiempo Real	
			(+)	%	(+)	%
Alimentos en la vía pública	Pincho	15	8	53,33	15	100
	Shawarma	15	10	66,77	15	100
	Hamburguesa	15	6	40	15	100
	Total/Promedio	45	24	53,36	45	100

Tabla 2. Distribución del número de repeticiones por alimento con sus respectivas concentraciones promedio en (ug/ml).

Tratamiento	Repeticiones	Promedio Conc. <i>E.coli</i> (ug/ml)
Pincho	12	7,25
Shawarma	18	6,02
Hamburguesa	8	15,73

En la Tabla 1 se muestran los casos positivos de *E.coli* por tipo de alimento analizado y el método utilizado y finalmente en la Tabla 2 se muestra la distribución del número de repeticiones por tratamiento con los promedios de sus respectivas concentraciones en ug/ml.

4. Discusión y conclusiones

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontraron similares resultados con respecto a la concentración de *E. coli* en alimentos expendidos en la vía pública. Al igual que Yáñez *et al.* (2008), con respecto al uso de la PCR en Tiempo Real para la detección rápida de *E. coli.*, directamente de alimentos, se encontró que esta técnica presenta varias ventajas.

La PCR en Tiempo Real para la detección y cuantificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, presenta mayor sensibilidad, especificidad y capacidad para procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo. En ese sentido, esta metodología durante el presente tra-

bajo demostró alta sensibilidad y rapidez debido al corto tiempo utilizado para la detección *E. coli*. Cabe mencionar, que la técnica de PCR en Tiempo Real tarda en promedio 24 horas, en contraste con el método convencional que tarda alrededor de tres a cuatro días.

En la Tabla 2 se muestra la concentración de *E. coli* con sus repeticiones y el tipo de alimento analizado, así: las muestras de Shawarma presentan una carga de 6,02 ug/ml, seguido de las muestras de Pinchos con 7,25 ug/ml y las muestras de Hamburguesas 15,73 ug/ml. En conclusión después de los análisis se pudo determinar que la mayor carga bacteriana está asociada a las hamburguesas, esto puede deberse a varios factores: que contienen la mayor carga bacteriana. Hubiese sido imposible por el método convencional detectar toda esta carga bacteriana específica.

Se puede pensar que al realizar un muestreo semanal, podrían existir cambios en la carga bacteriana por muestra de alimento y por establecimiento, ya que existe también un cambio de equipo de trabajo que preparan los alimentos, que puede incidir en los resultados que se obtienen.

Además, existen otros estudios como por ejemplo el de (Daum *et al.*) en donde se corrobora que se puede encontrar mayor presencia bacteriana en alimentos que contengan carne de res, carne molida, verduras y legumbres mal limpiadas y desinfectadas como es el caso de las Hamburguesas en este estudio. Como se sabe es muy importante mantener una adecuada asepsia en el procesamiento y expendio de los alimentos, en Ecuador es difícil un adecuado mantenimiento de limpieza y el correcto acceso al agua y electricidad en los establecimientos de comida rápida en la vía pública.

Se puede concluir entonces, que los diferentes establecimientos de comida rápida que se encuentran adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana, presentan falencias en el manejo, procesamiento y distribución de los alimentos que expenden. Adicionalmente, se conoce que varios de los estudiantes que son asiduos consumidores de este tipo de alimentos y establecimientos han presentado graves problemas gastrointestinales asociados a la mala manipulación en estos procesos.

Al encontrar un 100 % de los casos positivos para las muestras analizadas, se realizó una comprobación en el equipo y se corrieron dos veces las mues-

tras para poder tener la certeza en la cuantificación y detección, al ser este método tan sensible se obtuvieron incluso valores mínimos que hubiese sido imposible detectar por el método convencional, toda esta carga bacteriana específica.

En conclusión, los resultados obtenidos permiten determinar que la técnica molecular presenta muchas ventajas para la detección de patógenos en alimentos y sobre todo para el análisis de la distribución de productos inocuos para los consumidores.

Finalmente y dejando de lado la diferencia entre las técnicas se considera preocupante y como un riesgo de salud pública la carga bacteriana (Sharma y Carlson, 2000) de *E. coli* (Tabla 2) en los alimentos que se venden sin control sanitario en las cercanías de los establecimientos de educación en Quito, siendo una causa de interés conocer cuáles son los alimentos que se pueden consumir en mayor o menor medida con seguridad y seguir realizando estudios como estos.

5. Agradecimientos

A Ivonne Vaca por su valioso aporte en el análisis de datos y al equipo de trabajo que se comprometió con la Investigación.

Referencias

- Almeida, C. 2002. **Sistemas modernos de inspección y control de alimentos**. Bogotá, Colombia, pág. 315.
- Arola, L., E. Arroyo y B. I. 2008. **Genética, Nutrición y Enfermedad**. Edimsa.
- Barleta, F., T. Ochoa y L. Ecker. 2009. **Validation of five-colony pool analysis using multiplex real-time pcr for detection of diarrheagenic escherichia coli**. J Clin Microbiol.
- Bustos, R. 1997. **Informe final y documentos seleccionados. X reunión interamericana de salud animal a nivel ministerial**. En: **Comisión Nacional Asesora en Materia Alimentaria del Uruguay**, Ed. OPS: 83-91, Washington.
- Codex Alimentarius. **Código de prácticas de higiene para la elaboración y expendio**

- de alimentos en la vía pública en América Latina y el Caribe CAC/RCP 43-1995. URL http://www.codexalimentarius.net/download/standards/28/RCP_043s.pdf.
- Daum, L., W. Barnes, J. McAvin, M. Neidert, L. Cooper y W. Huff. **Real time PCR detection of Salmonella in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas.** J Clin Microbiol, 40(3050-2).
- Gálvez, E. 2011. **Calidad e inocuidad en las cadenas latinoamericanas de comercialización de alimentos.** URL <http://www.fao.org/Ag/ags/subjects/es/agmarket/agsfop>, consulta 15 de junio de 2011.
- González, T. y R. Rojas. 2005. **Enfermedades transmitidas por alimentos y pcr: prevención y diagnóstico.** Rev Salud Pub Mex.
- Guion, C., T. Ochoa y W. CM. 2008. **Detection of diarrheagenic escherichia coli by use of melting-curve analysis and real-time multiplex pcr.** J Clin Microbiol.
- Hannaoui, E., L. Villalobos y R. Martínez. 2010. **Escherichia coli diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela.** SciELO.
- Instituto Nacional de Salud. 2008. **Enfermedades transmitidas por alimentos.** URL <http://www.ins.gov.co/pdf/vcsp/Protocolo>, consulta 12 de mayo 2012.
- Roche Diagnostics. 2010. **LightCycler® foodproof E. coli detection kit.** GmbH, Mannheim, Germany.
- Rojas, R. y T. González. 2006. **Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa.** Rev Bioquímica.
- Romo, L. A. 1973. **Métodos de experimentación científica.** Quito - Ecuador.
- Sanchez-Otero. 2013. **Introducción a la estadística en las ciencias biológicas.** Quito - Ecuador.
- Sharma, V. y S. Carlson. 2000. **Simultaneous detection of Salmonella strains and Escherichia coli O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture.** Appl Environ Microbiol, 66(5472-6).
- Yáñez, E., S. Máttar y A. Durando. 2008. **Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba.** Asociación Colombiana de Infectología.