

# VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DUPLEX PCR PARA LA DETECCIÓN DE *C. perfringens* EN ALIMENTOS

Hostench, M. C.; Olmedo, M.; De Andrade Cattapan, R.; Monzón, C.; Vivas, L.; Batista, L.; Alvarez, M.  
**INTI Agroalimentos**  
hostench@inti.gob.ar

## **OBJETIVO**

Los objetivos de este trabajo fueron: i) validar una técnica de dúplex<sup>a</sup> PCR (Polimerase Chain Reaction) para la detección de *C.perfringens* productor de enterotoxina; ii) identificar aislados enterotoxigénicos de *C.perfringens* y iii) comparar distintos métodos de extracción de ADN a partir de alimentos.

<sup>a</sup> La dúplex PCR es una PCR en donde se utilizan dos pares de primers para amplificar dos regiones distintas del genoma.

## **DESCRIPCIÓN**

El *Clostridium perfringens* es una bacteria formadora de esporas, anaerobia y ubicua que produce Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Las cepas son clasificadas en 5 biotipos (A a E) basados en su habilidad para producir 4 toxinas principales: alfa ( $\alpha$ -), beta ( $\beta$  -), épsilon ( $\epsilon$  -) e iota ( $\iota$  -) (1). La  $\alpha$ -toxina es producida por todos los tipos de cepas y es codificada por el gen *cpa*, por lo que es éste gen el que se utiliza para la determinación de *C. perfringens*. Existen otras toxinas producidas por algunas cepas de *C. perfringens*, entre ellas la enterotoxina (CPE), la cual es codificada por el gen *cpe* y producida por el tipo A. Son las cepas productoras de enterotoxina las causantes de los brotes, ya que es la enterotoxina el factor de virulencia que causa la enfermedad (2). Los síntomas que predominan son: diarrea y dolor abdominal, que aparecen entre las 6 y las 24 h posteriores a la ingestión del alimento contaminado.

A diferencia de las otras toxinas, la CPE solo es producida durante la esporulación, y la bacteria esporula pobremente en los medios usuales de cultivo, complicando la identificación de cepas enterotoxigénicas basadas en la detección de CPE por métodos inmunoenzimáticos. Por otro lado, al tratarse de un microorganismo anaerobio estricto, su cultivo es dificultoso. La detección de *C. perfringens* por la técnica de PCR permite obtener resultados rápidamente evitando el tiempo que conlleva el aislamiento y la esporulación.

## **Materiales y métodos**

Todas las muestras fueron analizadas por el método tradicional (FDA-BAM, Compendium of Analytical Methods Canada MFHPB-23 Ed. 1992) y el método de PCR.

Cultivo e Identificación de *C.perfringens*: Se sembraron 10 g de distintos alimentos (sopas deshidratadas, gelatina, pan dulce, proteína de soja) en 90 ml de caldo tioglicolato. Se incubó 24 h a 35 °C bajo condiciones anaerobias. Se sembró en agar TSC (triptosa-sulfito-cicloserina) con yema de huevo. Las colonias características fueron aisladas e identificadas por pruebas bioquímicas: tinción de Gram, producción de lecitinasa, producción de ácido sulfhídrico, crecimiento a 45°C, movilidad, reducción de nitrato, licuefacción de gelatina, producción de gas a partir de la lactosa.

Cepas: Se utilizaron 12 cepas de *C.perfringens* aisladas por el laboratorio a partir de alimentos y como cepas de referencia el *C. perfringens* ATCC 13124 y *C. perfringens* BE 305/09.

Aislamiento de ADN: i) Para la extracción de ADN a partir de la cepa pura las cepas de *C. perfringens* se hicieron crecer en placas de agar cerebro corazón (BHA) bajo condiciones anaerobias a 35 °C por 24 h. Se resuspendieron algunas colonias en 200  $\mu$ l de agua tridestilada y se calentó a 100 °C durante 20 minutos. Se centrifugaron los microtubos durante 15 min a 12 000 rpm y el sobrenadante fue utilizado como templado de la PCR.

ii) Para la extracción de ADN bacteriano a partir del alimento se realizó un enriquecimiento de 10 g del alimento en 90 ml de caldo tioglicolato. Se incubó 24 h a 35°C bajo condiciones anaerobias. Se extrajo el ADN bacteriano de tres maneras distintas: 1) técnica del laboratorio basada en la técnica utilizada para la extracción de ADN a partir de la cepa pura, 2) kit comercial de extracción Nucleo Spin® Food (Macherey- Nagel) y 3) kit comercial de extracción *SureFood*® *PREP Allergen* (R-Biopharm).

Amplificación: Para la duplex PCR se amplificó el gen *cpa* y el gen *cpe* según lo descripto por

Meer and Songer 1997 (3). Las condiciones del ciclado fueron 94 °C 1 min, 30 ciclos de 94 °C 1 min, 55 °C 1 min y 72 °C 1 min con una extensión final de 72 °C 5 min. Los productos de la PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% (100V, 40 min) y observados bajo un transiluminador UV.

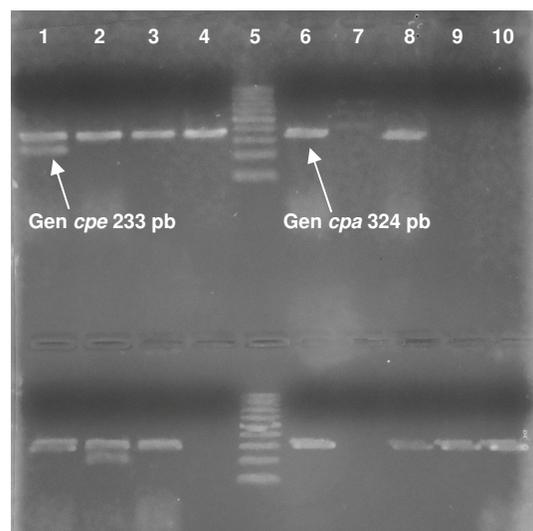
**Especificidad de la PCR:** La especificidad de la PCR fue testeada utilizando otras especies de *Clostridium*: *C.sordellii* ATCC 9714, *C.sporogenes* ATCC 3584, *C.sporogenes* CICAA. B007, *C.paraperfringens*. También fueron testeadas otras bacterias frecuentemente asociadas con ETA: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enterica* ATCC 7378.

## RESULTADOS

### Duplex PCR:

Se realizó una dúplex PCR para la detección del gen de la  $\alpha$ -toxina (*cpa*) y de la enterotoxina (*cpe*), obteniéndose un producto de 324 bp y 233 bp respectivamente.

Los productos de PCR fueron claramente visibles y fácilmente distinguibles uno de otro (Fig.1)



**Figura 1:** Calles superiores: 1) *C.perfringens* BE 305/09, 2) *C.perfringens* ATCC 13124, 3) *C.perfringens* aislado de gelatina, 4) *C.perfringens* aislado de proteína de soja, 5) Marker, 6) *C.perfringens* aislado de sopa deshidratada de arvejas, 7) *C. sordellii* ATCC 9714, 8) *C.perfringens* aislado de sopa deshidratada de espinaca, 9) Control negativo *Salmonella* 10) Control de reactivos. Calles inferiores: 1) *C.perfringens* aislado de pan dulce, 2) *C.perfringens* aislado de gelatina, 3) *C.perfringens* aislado de sopa deshidratada de zapallo, 4) *C. sporogenes* ATCC 3584, 5) Marker, 6) Sopa deshidratada de arvejas utilizando kit R-biopharm 7) Sopa deshidratada utilizando la técnica del laboratorio para la extracción de ADN 8) Sopa deshidratada de arvejas utilizando kit Macherey-Nagel, 9) Sopa deshidratada de zapallo utilizando kit Macherey-Nagel 10) Sopa deshidratada de zapallo utilizando kit R-biopharm.

Un total de 12 cepas de *C. perfringens* se obtuvieron a partir de distintos alimentos utilizando el método tradicional para investigación de *C. perfringens*. Las 12 cepas fueron analizadas por PCR mostrando la amplificación del gen estructural de la  $\alpha$ -toxina (*cpa*), lo que confirma que se trata de *C.perfringens* y sólo en 3 cepas fue detectado el gen *cpe*, lo que determina que tienen la capacidad de producir enterotoxina.

Ninguna de las otras especies de *Clostridium* ni las Enterobacterias testeadas produjeron el fragmento de 324pb, lo que indica que el método de PCR validado es específico para *C.perfringens*.

### Extracción de ADN:

En cuanto a la extracción de ADN bacteriano a partir del alimento se obtuvieron resultados exitosos utilizando ambos kits comerciales, pero, a pesar de ser una técnica más sencilla y económica, no fue posible extraer el ADN utilizando la técnica del laboratorio, debido a los interferentes presentes en los alimentos.

## CONCLUSIONES

Se observó que la duplex PCR es un método rápido, confiable y específico para la detección de *C. perfringens* y es capaz de discriminar cepas potencialmente enterotoxigénicas.

El aislamiento directo de ADN a partir de la célula vegetativa de *C. perfringens* elimina la necesidad de fomentar la esporulación en orden de obtener la toxina en cantidades suficientes para la detección por métodos inmunoenzimáticos. Además la capacidad de esporular in vitro puede variar con diferentes medios de cultivo, por lo que la PCR demuestra ser un método rápido y adecuado para la detección de la enterotoxina.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Garmory, H. S., Chanter, N., French, N. P., Bueschel, D., Songer, J. G. & Titball, R. W. (2000). Occurrence of *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.*, 124, 61-67.
- (2) Schoepe, H., Potschka, H., Schlapp, T., Fiedler, J., Schau, H. & Baljer, G. (1998). Controlled multiplex PCR of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in food samples. *Molecular and Cellular Probes*, 12, 359-365.
- (3) Meer, R. R., Songer, J. G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. vet. Res.*, 58: 702-705.