



**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**-UNCPBA-**

**“Diferentes métodos para detección y aislamiento  
de *Salmonella spp* en reses porcinas”**

**Ramallo, Grisel; Villalobo, Cristina; Etcheverría, Analía; Padola, Nora L.**

**Octubre 2017, Tandil.**

**“Diferentes métodos para detección y aislamiento de *Salmonella* spp en reses porcinas”.**

Tesina de la Orientación Tecnología de los Alimentos, presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Veterinario del estudiante: Ramallo Grisel Anabella

Tutor: **Med. Vet. Villalobo, María Cristina**

Director: **Dra. Med. Vet. Padola, Nora Lía**

Codirector: **Dra. Med. Vet. Etcheverría Analía Inés**

Evaluador: **Dra. Med. Vet. Monteavaro Cristina Esther**

## **Dedicatoria**

*-A mis padres, que sin el sostén que me brindan desde el día que llegue a este mundo no sería capaz de haber logrado lo que soy.*

*-A mis hermanos, que soy muy feliz de tenerlos.*

*-A mi compañero de vida, por comprender y acompañar el camino que elijo y emprendo cada día.*

## **Agradecimientos**

*-Mi eterno agradecimiento a Cristina Villalobo; mi tutora de tesis que aun cursando con cuestiones personales siempre se ocupó y preocupó por acompañarme en este proceso de aprendizaje.*

*-A Julia Ruiz por su acompañamiento incondicional y su desinteresada predisposición ante cada inquietud que me surgía. Sin ella no podría haber logrado el desarrollo de este trabajo. Orientó y guió cada uno de mis pasos por el laboratorio.*

*-A mi directora y codirectora Nora y Analía por confiar en mi para realizar este trabajo.*

*-A Cristina Monteavaro por no dudar un segundo en brindarme sus conocimientos y ayuda cada vez que se lo he solicitado.*

*-A Elida Elichiribehety por estar siempre atenta a mis necesidades académicas guiando y apoyando.*

*-A las personas del laboratorio de ADN Inmunoquímica y Biotecnología por el cálido clima que me ofrecieron durante mis días de trabajo.*

*-A las personas del laboratorio de Microbiología clínica y experimental por la hospitalidad con la que me recibieron y su desinteresada participación en el desarrollo de mi trabajo.*

*-A esta casa de estudios por brindarme la posibilidad de graduarme en una Universidad Pública.*

## Resumen

Según la OMS la salmonelosis es una de las enfermedades transmitida por alimentos (ETA) de mayor casuística, ampliamente extendida en todo el mundo. La enfermedad es producida por el género *Salmonella* spp. y causa una de las zoonosis más frecuentes y de mayor impacto económico. El hombre adquiere la infección después de la ingestión de alimentos contaminados, aunque también puede transmitirse de persona a persona o por vía fecal-oral. Actualmente, las técnicas microbiológicas de aislamiento convencional para detección de *Salmonella* spp. son establecidas por el Código Alimentario Argentino (CAA) para verificar la aptitud de un producto para consumo, pero éstas requieren de 4 a 5 días para la obtención de un resultado, tiempo que juega en contra para el productor y la conservación de dichos alimentos. Por este motivo en este trabajo se analizan los métodos de diagnóstico tradicional, los métodos de inmunoensayo comerciales y la técnica PCR. Esta última, es una herramienta molecular sencilla y rápida que detecta la presencia del gen *InvA* altamente implicado en el proceso de invasión en cepas patógenas. Se analizaron un total de 60 muestras procedentes de reses porcinas a punto de ser comercializadas. Se realizó PCR directo de zona confluyente y de colonias individuales. En forma simultánea se llevaron a cabo identificación mediante pruebas bioquímicas y test comerciales de identificación. Las pruebas bioquímicas que se realizaron son aquellas establecidas según Normas ISO 6579:2002 con algunas modificaciones. Los resultados obtenidos detectaron *Salmonella* spp. en 7 de las 60 muestras. Se pudo determinar en el ensayo que el diagnóstico molecular por PCR posee alta sensibilidad, pero no es alentador el resultado que reflejan los test comerciales inmunocromatográficos ya que queda en evidencia la necesidad de una alta carga microbiana para un diagnóstico certero.

**Palabras clave:** *Salmonella* spp. - PCR – Inmunocromatografía - Pruebas bioquímicas - reses porcinas

<b>Indice</b>	<b>Pág.</b>
<i>Introducción.....</i>	<i>1</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>3</i>
<i>Antecedentes del tema.....</i>	<i>4</i>
<i>Materiales y métodos.....</i>	<i>10</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>19</i>
<i>Discusión.....</i>	<i>21</i>
<i>Conclusión.....</i>	<i>23</i>

## La siguiente tesina se encuadra en el orientador: DISEÑO EXPERIMENTAL.

### Introducción

En Argentina, los datos disponibles de casos clínicos positivos a *Salmonella* spp. en humanos son aquellos publicados en los Boletines Epidemiológicos del Ministerio de Salud de la Nación, por el SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) causadas por *Salmonella* spp. son de notificación obligatoria (Ley 15.465) y entre ellas se incluye únicamente la Fiebre Tifoidea y Paratifoidea, cuyos agentes etiológicos son *S. typhi* y *S. paratyphi*. Por esta razón no se conocen cifras reales sobre el impacto de esta enfermedad en Argentina de casos de Salmonelosis no-tíficas.

Al considerar los escasos datos disponibles es evidente que *S. Enteritidis* es la más frecuentemente aislada de humanos y alimentos de consumo humano y animal (Caffer *et al.*, 2007).

En Argentina, a partir de 1972 se serotifican las cepas de *Salmonella* en forma continua. Sin embargo, no se diferencia la notificación de casos de Fiebre Tifoidea de Fiebre Paratifoidea, y la infección por *Salmonella* no se informa en la planilla C2 de notificación obligatoria, salvo en casos de brotes. Entre 1993 y 2002 ocurrieron 152 brotes de ETA que afectaron a 3.309 personas, de las cuales 4 fallecieron, el 33% de los brotes de ETA causados por *Salmonella* spp. se produjo por consumo de agua contaminada y el 27% fue debido al consumo de carnes rojas (SIRVETA, 2000).

En 2006, 160.649 casos de salmonelosis fueron diagnosticados en la Unión Europea y se considera que de un 10 al 13% tienen origen en carne porcina (Baptista *et al.*, 2009). En Estados Unidos, se ha descrito que el 56.8% de la salmonelosis humana puede ser atribuible a los cerdos (BIOHAZ, 2012). Se han llegado a reportar anualmente hasta 1.4 millones de casos por *Salmonella* spp., cuyas pérdidas se acercan a 25 millones de dólares (Kingsley *et al.*, 2000).

Diversos estudios han demostrado la prevalencia y seroprevalencia de *Salmonella* en granjas porcinas, así como los factores de riesgo asociados a la

presencia de la bacteria (Colello *et al.* 2016). De la misma manera, se reporta la prevalencia en carcasas en las plantas de sacrificio y en expendios de carne porcina (Arguello *et al.*, 2012; Gonzales-Barron *et al.*, 2012; Methner *et al.*, 2011). Actualmente hay 2.463 serotipos (serovares) de *Salmonella* (Libby y col 2004). Las fórmulas antigénicas de los serotipos de *Salmonella* son definidas y mantenidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro Colaborador para Referencia e Investigación de *Salmonella* en el Instituto Pasteur, París, Francia (colaborador de la OMS Centro). Nuevos serotipos se enumeran en las actualizaciones anuales del esquema de Kauffmann-White.

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, la microbiología clínica necesita optimizar sus diagnósticos a nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez. Entre las alternativas propuestas a estos retos, se estudiaron técnicas basadas en los principios de la Biología Molecular acortando los tiempos de entrega de los resultados. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la principal herramienta diagnóstica. Los inicios de la PCR se remontan a 1971, cuando un artículo publicado por Kleppe y colaboradores, en el *Journal of Molecular Biology* describió por vez primera un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro*. Sin embargo, este ensayo no recibió mucha atención y la autoría de la PCR fue atribuida 12 años después a Kary Mullis perteneciente a la *Cetus Corporation*, California SA. La puesta en escena de la PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces su uso se ha extendido a distintos países. Entre los microorganismos patógenos cuya detección requiere difundir el uso de PCR se encuentran los pertenecientes al género *Salmonella* realizando amplificación del gen *InvA*, ya que diversas líneas de investigación coinciden en que es un factor de virulencia ligado a la invasividad (Luigi *et al.*, 2015).



**Objetivo general**

-Utilizar diferentes métodos moleculares, fenotípicos e inmunocromatográficos para la detección de *Salmonella* spp en medias reses porcinas.

**Objetivos particulares**

-Realizar pruebas bioquímicas de identificación. Analizar resultados obtenidos a partir de pruebas bioquímicas.

-Realizar PCR para la detección de gen *InvA*.

-Utilizar test de inmunocromatografía para evaluar resultados.

-Establecer relación entre los métodos probados.

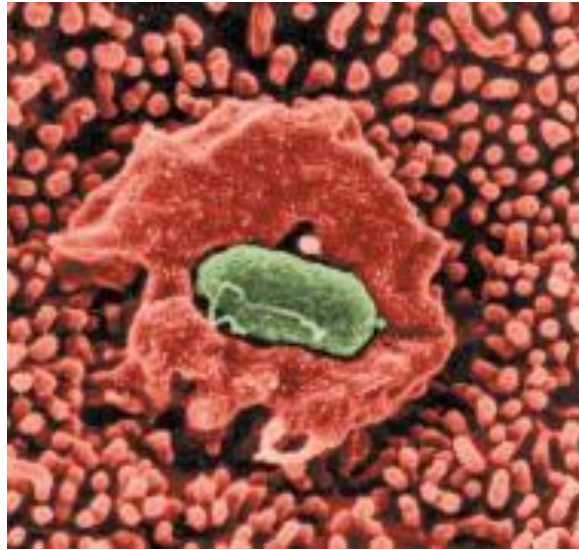
## Antecedentes del tema

*Salmonella* es una enterobacteria Gram negativa que fue descrita por primera vez en el año 1885 por el bacteriólogo Daniel E. Salmon quien aisló *Salmonella* a partir del intestino de porcinos. La mayor parte de los serotipos son patógenos para los animales y afectan al hombre accidentalmente. (Salmon y Smith, 1886). Crecen en medios de cultivo simples de peptona o extracto de carne y en medios selectivos como el agar Mac Conkey, Salmonella-Shigella, XLT4 y/o Hektoen. Son aerobios-anaerobios facultativos, utilizan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas mediante los procesos de oxidación y fermentación, son catalasa positivo y oxidasa negativos, reducen el nitrato a nitrito y tienen un contenido de G+C del 39-59% (Bergey's, 2005). La temperatura óptima de desarrollo de *Salmonella* es de 35°C – 37°C, con un rango de temperatura de 5°C a 47°C, desarrollan a pH entre 4 - 9, siendo su pH óptimo 6.5 - 7.5. Su crecimiento en medios líquidos se observó con un  $a_w$  entre 0.945 y 0.999 (Koneman et al., 1999). Son incapaces de tolerar elevadas concentraciones de ClNa. *Salmonella* es destruida a las temperaturas de pasteurización de la leche (Linder, 1995).

*Salmonella* infecta a cerdos que son reconocidos como una importante fuente de infección para humanos (Mastroeni et al., 2000). Pueden provocar enfermedad subclínica, diarrea leve, hasta una severa enfermedad sistémica. En el sistema de producción porcina las infecciones en cerdos están principalmente asociadas con los serovares *choleraesuis* y *typhimurium* (Mejía, 2003). La contaminación originada en las granjas se transfiere de materia fecal los cerdos a las canales, y con el manipuleo y el procesamiento de las mismas en el desposte, aumenta en los diferentes cortes de carne. La entrada de estos patógenos en la cadena alimentaria representan un riesgo para la salud pública (Colello et al., 2016). La expresión de los genes de virulencia se inicia cuando *Salmonella* spp. entra en contacto con el medio ambiente hostil que representa el tracto gastrointestinal del huésped, donde encuentra una gran variedad de condiciones como la osmolaridad, la tensión de oxígeno y el pH. Estas actúan como señales para que inicie la transcripción de genes que codifican factores de virulencia, los cuales

favorecen la interacción con la célula blanco durante la patogénesis (Hueck, 1998). La principal ruta de transmisión de *Salmonella* spp. en los cerdos es la ruta fecal-oral. Tras su entrada por vía oral, es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal y aparecer en heces lo que facilita la contaminación del ambiente y la transmisión entre animales. Los cerdos son reservorios de *Salmonella* spp. y existe un aumento de estos patógenos con el manipuleo de las canales en salas de desposte, ya que se considera que el medio ambiente del criadero y las instalaciones en las distintas etapas podrían ser hábitat de *Salmonella* spp. (Colello *et al.*, 2016).

Los factores de virulencia son estructuras o metabolitos que producen daño o alteraciones metabólicas en la célula del hospedador. Algunas estructuras superficiales que podemos mencionar serían LPS, sistemas de secreción, fimbrias. Estos factores se encuentran codificados en genes de virulencia, localizados en el cromosoma o en plásmidos. Estos genes pueden estar en: islas de patogenicidad (sistemas de secreción), genes aislados y plásmidos de virulencia. Las islas de patogenicidad de *Salmonella* spp. (IPS) se definen como largas agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano, que codifican para determinantes responsables de establecer las interacciones específicas con el hospedador y que son necesarios para la expresión de virulencia bacteriana en un modelo animal. *Salmonella* spp. tiene dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad distintas IPS-1 e IPS-2. Los sistemas de secreción tipo III, es un grupo de estructuras especializadas de algunos géneros de bacterias Gram negativas, cuya finalidad es introducir proteínas efectoras al citosol de células eucariotas con el fin de desequilibrar su función (Hueck, 1998). El gen *invA* codifica un factor de virulencia relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal durante el proceso de infección. Es común en todas las variedades invasoras, esto significa que se puede asociar con posibles cuadros virulentos (Zhang *et al.*, 2002; Malorny *et al.*, 2003). Además, este gen fue utilizado en estudios para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos, debido a la estabilidad genética que presenta (Daum *et al.*, 2004).

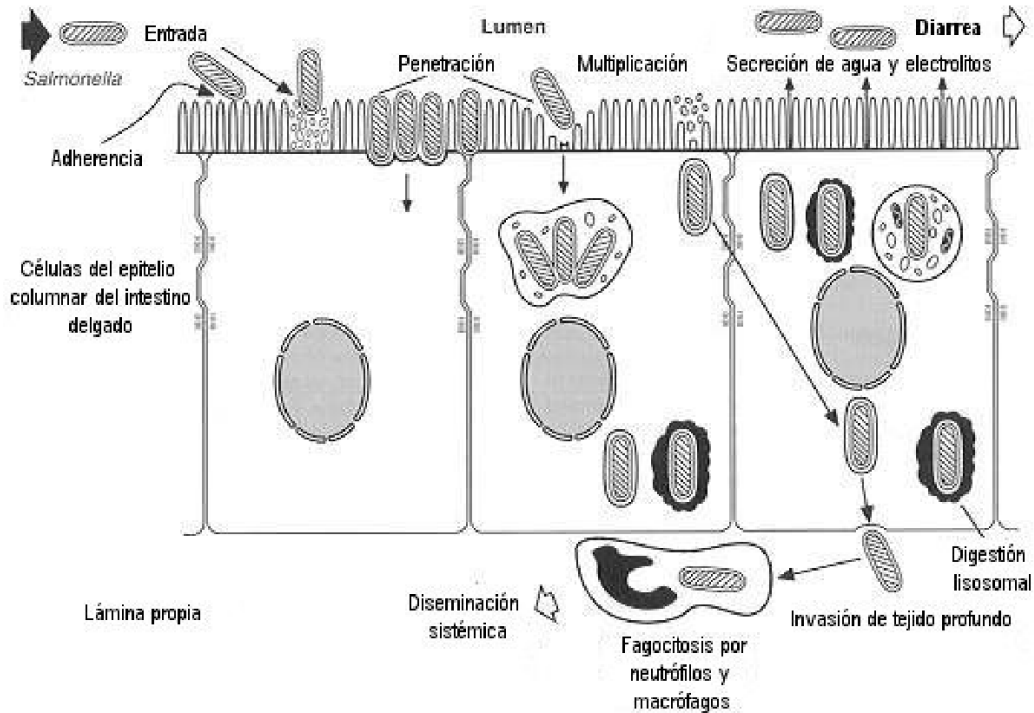


**Fig.1-Interacción de *Salmonella* spp. con células intestinales (Patel y Galán, 2005).**

#### PATOGENIA

La bacteria ingresa en el hospedador vía digestiva a través de alimentos o agua contaminados. Para la mayoría de los serotipos la dosis infectiva mínima se sitúa alrededor de  $10^5$  - $10^6$  bacterias/ml. Una vez ingeridas, las bacterias alcanzan el estómago donde se enfrentan al jugo gástrico y a un pH muy ácido, esto reduce el número de microorganismos viables. Aquellos capaces de sobrevivir pasan al intestino donde deberán resistir los ácidos grasos bactericidas producidos por la microbiota normal del hospedador, la secreción de mucina, la continua eliminación de células epiteliales y el peristaltismo intestinal que evitan la colonización. Además, la monocapa celular del epitelio intestinal supone una barrera física (Pestka *et al.*, 1985).

Las bacterias que escapan a la primera línea de defensas intestinales, colonizan el íleon y/o el colon e invaden el epitelio. El mecanismo de invasión implica la unión inicial a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida por la internalización forzada por la propia bacteria (Walli Galyov, 2000) Fig.1.



**Fig.2- Esquema de la invasión de la mucosa por Salmonella (Ralph, 1996).**

La invasión depende de la acción de un sistema de secreción tipo III (SSTIII), codificado por la isla de patogenicidad IPS-1. Una vez invadido el epitelio intestinal, las bacterias se traslocan rápidamente alcanzando la lámina propia. Aquí, su reconocimiento por receptores localizados tanto en la superficie de macrófagos como en la cara interna de las células intestinales, origina la producción de más citoquinas por ambos tipos de células. Esto provoca la afluencia masiva de polimorfonucleares. Además, las células inflamatorias intentan fagocitar y destruir a las bacterias. *S. entérica* posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos impidiendo la unión fago-lisosoma y gracias a la actuación de un segundo SSTIII, codificado por la isla de patogenicidad IPS-2 y de otros factores de virulencia Fig.2. Los polimorfonucleares liberan prostaglandinas que tienen acción sobre el metabolismo de la enzima adenilatociclasa que incrementa los niveles de AMPc. El aumento de AMPc interrumpe la absorción de Na<sup>+</sup> y aumento la eliminación de Cl<sup>-</sup>, lo que lleva a una pérdida de agua por parte de la célula y provoca los evidentes signos de una diarrea (Salyers y Whitt, 2002).

Los macrófagos que reconocieron y fagocitaron bacterias también liberan IL-12, responsable del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleuquina actúa sobre los linfocitos T de tipo Th1, que a su vez liberan sustancias como el interferón gamma, que activan a macrófagos adquiriendo estos la capacidad de destruir a las bacterias que sobreviven en su interior (Raffatellu *et al.*, 2006). El espacio de incubación tras la ingestión de alimentos o agua contaminados con *Salmonella* oscila entre 8 y 72 h y el cuadro clínico se inicia con náuseas y vómitos seguidos de dolor abdominal y deposiciones diarreicas, normalmente de moderado volumen y que suelen contener polimorfonucleares (Mims *et al.*, 1995). Más de la mitad de los casos se asocian con fiebre con temperatura corporal de hasta 38 y 39°C. Es frecuente la aparición de cólicos abdominales. Con menos frecuencia se describieron síntomas como cefaleas, mialgias y otros (Miller y Pegues, 2000). Normalmente se trata de una enfermedad autolimitada, los síntomas desaparecen en un período de 2 a 5 días. En el caso de la enteritis, la enfermedad remite en 2 a 3 semanas. La remisión de los síntomas coincide con la puesta en marcha de la respuesta inmune específica del hospedador, que consigue controlar la infección, gracias a la activación de los macrófagos. En pacientes aparentemente sanos las infecciones intestinales por *Salmonella* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales. Esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias fagocitadas. Probablemente transportada por fagocitos, *S. entérica* se dispersa por el organismo inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea. Así se origina una bacteriemia que puede causar enfermedad clínica o subclínica, con elevado riesgo de evolucionar a septicemia por la multiplicación bacteriana. Ésta puede transcurrir como infección no localizada, que se manifiesta con fiebre, cuyos síntomas pueden persistir varias semanas e incluso generar shock séptico, debido a la actuación de la endotoxina a nivel de sistema circulatorio. Además, al diseminarse por el organismo, *S. entérica* puede llegar a colonizar diversos órganos, provocando infecciones focales que afectan fundamentalmente al tracto urinario, vesícula biliar, hígado, huesos. Se registraron también meningitis, neumonías, endocarditis y otros cuadros clínicos graves (Rodríguez *et al.*, 1998,

2006; Benenson *et al.*, 2001). Después de la infección por *Salmonella* (infección intestinal, fiebre entérica o infección urinaria) la eliminación de la bacteria por las heces o la orina persiste durante 4 a 5 semanas. En estos casos se considera el estado de portador convaleciente. También existe el estado de portador crónico asintomático, que constituye una forma de infección más frecuente que la inflamación intestinal aguda y puede deberse al contacto con dosis infectivas bajas de *Salmonella*. Se consideran igualmente portadores crónicos a aquellos que continúan eliminando *Salmonella* en heces por períodos superiores a un año, hecho que ocurre entre el 1% y el 3% de los pacientes con Fiebre Tifoidea, que llegan a excretar cantidades del orden de  $10^6$  - $10^9$  bacterias por gramo de heces. En otros serotipos no tifoideos el estado de portador crónico se da en el 1% de los pacientes mayores de quince años y en el 5,4% de los menores de dos años (Jones y Falkow, 1996; Millar y Pegues, 2000).

## **Materiales y Métodos**

### **Muestras a analizar**

Para este modelo experimental se utilizó una única matriz de muestras correspondientes a esponjados a partir de 60 reses porcinas. De las mismas se conservó 1 ml del cultivo en H<sub>2</sub>O de peptona con glicerol a -70°C para futuros estudios.

Se realizó PCR de cada muestra directamente de zona confluyente. Simultáneamente las muestras se procesaron para detección de *Salmonella* spp. por los métodos microbiológicos convencionales y a partir de colonias aisladas se realizaron pruebas bioquímicas y PCR, para detección del gen *InvA*.

### **Procesamiento y aislamiento de *Salmonella* spp.**

El procesamiento y el aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó según Normas ISO 6579:2002 con algunas modificaciones. Consta de cuatro etapas sucesivas: I- pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, II- enriquecimiento en un medio líquido selectivo, III- siembra en medios sólidos e identificación y IV- confirmación.

### **Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo**

Se extrajo una ansada de cada muestra criopreservada a -70°C de esponjados de reses porcinas y se cultivó en 3 ml de caldo Luria Bertani (LB). Se incubó por 37°C durante 24 h.

### **Enriquecimiento en medios líquidos**

A partir del caldo LB se inoculó 1 ml en 9 ml de caldo Rappaport. Se incubó a 42°C durante 24 h.



### Siembra en medio sólido

A partir de Rappaport se sembró una alícuota con ansa en anillo sobre la superficie del medio hasta agotar por estría. Se utilizó agar S-S (Salmonella-Shigella, Laboratorio Britania) y agar XLT<sub>4</sub> (Xilosa-Lisina-Tergitol 4, Laboratorio Merck) con agregado del suplemento Tergitol, incubándose por 37°C durante 24h.(Fig-3).

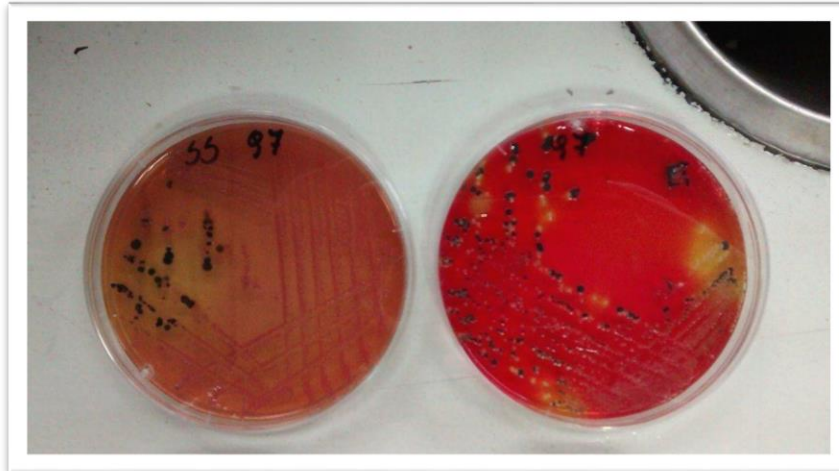


Fig 3-Colonias típicas de *Salmonella* spp. en medio S-S y XLT<sub>4</sub>.

### Confirmación

Se seleccionaron colonias típicas a *Salmonella* spp. en uno u otro medio empleado y se realizó cultivo puro para su confirmación mediante pruebas bioquímicas básicas y PCR.

### Pruebas bioquímicas

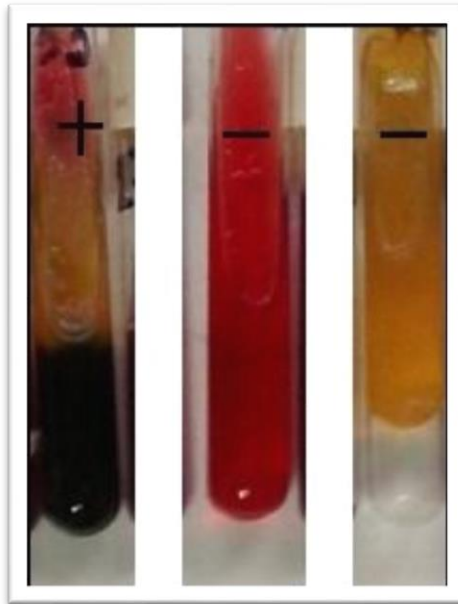
-Agar TSI (agar hierro tres azúcares, Laboratorio Britania): se punzó el fondo y se estrió la superficie en pico de flauta Se incubó por 37°C durante 24 h. Las colonias presuntivas a *Salmonella* spp. son pico alcalino/fondo ácido ((K/A), con o sin formación de gas, y producción de SH<sub>2</sub> precipitado negro Fig-4).

Interpretación:

-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo) precipitado negro en el fondo: el microorganismo solamente fermenta la glucosa y produce SH<sub>2</sub>.

-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.

-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.



**Fig 4-Interpretacion para TSI.**

-Agar LIA (agar lisina hierro laboratorio Britania): se punzó el fondo y se estrió la superficie en pico de flauta. Se incubó por 37°C durante 24 h. Las colonias presuntivas a *Salmonella* son pico alcalino/fondo alcalino (K/K) y producción de SH<sub>2</sub>(Fig-5).

Interpretación:

-Prueba Positiva: Pico alcalino/fondo alcalino (pico violeta/fondo violeta) y precipitado negro por la producción de SH<sub>2</sub>.

-Prueba Negativa: Pico alcalino/fondo ácido (pico violeta/fondo amarillo).



**Fig-5 Interpretación en medio LIA.**

-Urea (laboratorio Britania): Se seleccionaron solo aquellas muestras en las cuales el resultado de TSI fue K/A o dudoso. Se estrió la superficie en pico de flauta y se incubó por 37°C durante 24 h. Las colonias presuntivas a *Salmonella* son Urea (-). (Fig-6).

Interpretación:

-Prueba Positiva: Medio de cultivo es de color rosado-rojizo (microorganismos que hidrolizan la urea).

-Prueba Negativa: Medio de cultivo permanece de color amarillo (microorganismos que no hidrolizan la urea).

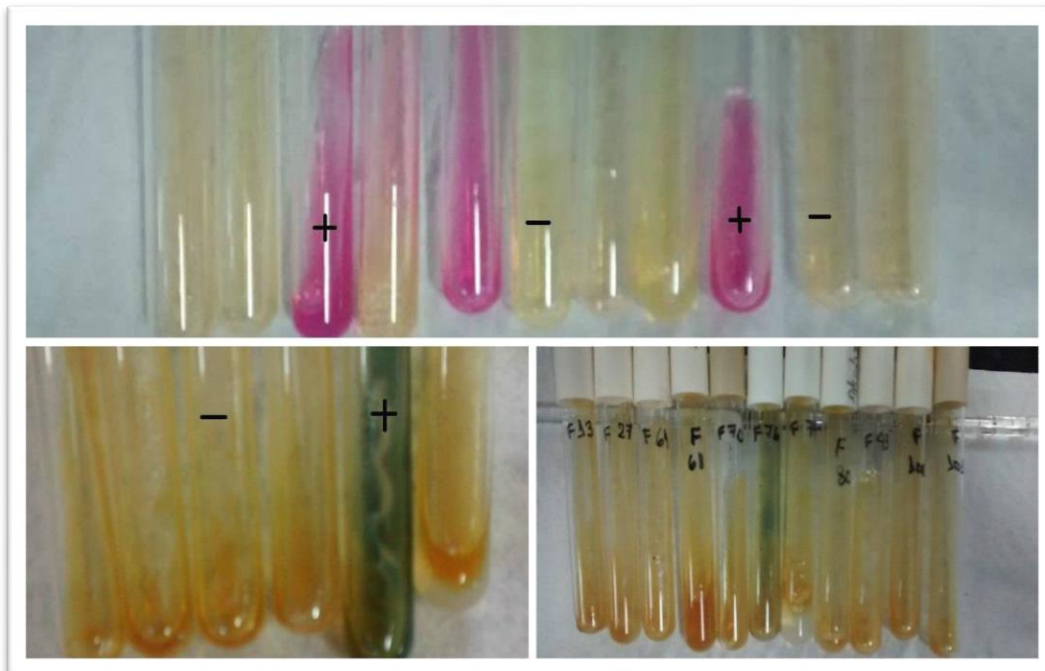
-FAD (Fenilalanina-Desaminasa, Laboratorio Britania): Se seleccionaron solo aquellas muestras en las cuales el resultado de TSI fue K/A o dudoso. Se estrió la superficie en pico de flauta y se incubó por 37°C durante 24 h. Previamente a

realizar la lectura se añade cloruro férrico. Las colonias presuntivas a *Salmonella* son FAD (-). (Fig-6).

Interpretación:

Prueba positiva: desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación.

Prueba negativa: sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.



**Fig-6. Resultados observados en medio Urea y FAD.**

-ONPG: Se seleccionaron solo aquellas muestras en las cuales el resultado de Urea y FAD fueron negativos, por cuestiones de costos. Se suspendió una ansada de cultivo puro en 0,2 ml de solución fisiológica. Luego se introdujo a cada tubo un disco y se incubó a 37°C. La primera lectura se realizó a los 30 min. y transcurridas 3 hs se hizo una lectura final. Los resultados esperados para *Salmonella* serian

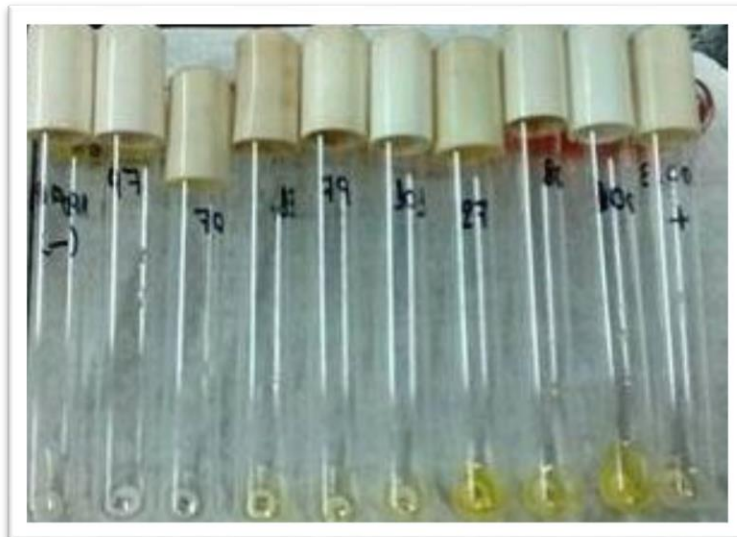
ONPG (-) a excepción de las subespecies *Arizonae* y *Diarizonae* que son ONPG (+).

Se utilizó como control negativo una cepa de *Pseudomonas* (se mantiene incolora la muestra) y como control positivo una cepa de *E.coli* (el medio viró a color amarillo). (Fig-7).

#### Interpretación:

Prueba positiva: color amarillo.

Prueba negativa: se mantiene incolora la muestra.



**Fig-7. Resultados observados por O.N.P.G con su control positivo y negativo.**

#### **Amplificación por PCR**

Las colonias presuntivas a *Salmonella* obtenidas por los métodos fenotípicos convencionales se sembraron en agar TSI y se incubaron por 24 h a 37°C. Se tomó cultivo puro y se colocó en 500 µl de agua bidestilada, llevándose a ebullición durante 10 min. para liberación de ADN. Posteriormente se detectó el gen *invA* por PCR.

Las cepas se conservaron a -70°C para sus posteriores caracterizaciones. Por otro lado se extrajo una ansada de cada muestra directa de zona confluyente y se colocó en 500 µl de agua bidestilada. Se extrajo el ADN mediante ebullición durante 10 min. Posteriormente se detectó el gen *invA* por PCR.

### **Cepas de referencia de *Salmonella***

Para la detección de factores de virulencia de *Salmonella* spp. (gen *invA*) se utilizó la siguiente cepa de referencia:

- *Salmonella* Dublín (*invA*<sup>+</sup>) proveniente del laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA.

### **Condiciones del ensayo**

El cóctel de reacción de PCR se realizó en una solución de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9, Tritón X-100 al 0,1%, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,01% de gelatina, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerasa (Highway®) y 5 µl de ADN.

La presencia del gen *invA* se determinó según metodología descrita por Rahn *et al.* (1992).

### **Condiciones de termociclado empleadas en la detección del gen *InvA*.**

Temperatura y tiempo inicial: 94°C 10min.

94°C 1 min

ciclos 2 a 30 60°C 1 min

72°C 2 min

Temperatura y tiempo final: 72°C 10min.

### **Primers empleados y tamaño de fragmentos amplificados**

Secuencia de *primers* empleados, tamaño de los productos amplificados y referencia bibliográfica.

**Cuadro-1. Secuencia de primers del gen *InvA*.**

<b>Gen</b>	<b>Primers (5'–3')</b>	<b>Tamaño del amplímero</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>
<i>invA</i>	S141.TCATCGCACCGTCAAAGGAACC S139- GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA	284 pb	(Rahn <i>et al.</i> , 1992)

La reacción de PCR se efectuó en un termociclador programable: T-17 *Ivema*. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de tamaño molecular DNA Ladder 100 bp (Promega®), que consta de 11 fragmentos con tamaños de 100 a 1500 pb, de los cuales la banda de 500 pb contiene el triple de concentración molar que el resto y sirve como un visible indicador de referencia.

### **RapidChek**

Aquellas muestras que dieron resultados positivos para PCR, ya sea directo de zona confluyente o a partir de colonias puras, independientemente del resultado que se haya observado en las pruebas bioquímicas fueron sometidas a un test de la marca RapidCheck® SELECT. Este posee anticuerpos anti-*Salmonella* actuando como un método inmunocromatográfico. Al introducir la tira reactiva en el medio de pre-enriquecimiento por un sistema de capilaridad se podrá observar o

no, según el resultado, la formación de dos bandas que pueden diferir en intensidad. (Fig-8).



**Fig-8. Test positivo por RapidCheck SELECT**



## Resultados

-Del total de 60 aislamientos procesados se obtuvo una positiva por PCR directo de zona confluyente en la que se observó presencia elevada de UFC de *Salmonella* spp. y otras 6 fueron positivas por PCR a partir de colonias puras.

-Sólo 4 fueron *Salmonella* spp. por pruebas bioquímicas.

-Se realizó RapidCheck sólo a las 7 muestras positivas por PCR, y únicamente 3 manifestaron bandas de color a la prueba de cromatografía.

A continuación se detalla los resultados obtenidos por pruebas bioquímicas solo muestras positivas por PCR Tabla 2.

**Tabla-2.Resultado de pruebas bioquímicas y aislamientos.**

N°MUESTRA	LIA	TSI	UREA	FAD	O.N.P.G
97	K/K H2S++	K/A H2S++	(-)	(-)	(-)
13	K/K	A/A	(-)	(-)	*
27	K/K	A/A	(-)	(-)	*
46	K/K H2S++	K/A H2S++	(-)	(-)	(-)
28	K/K	K/K	S/C	S/C	
29	K/K	A/A	(+)	(-)	
69	K/K	A/A	(+)	(-)	

S/C: Sin crecimiento.

\*:Sospechosa de cepas *Arizonae* y *Diarizonae*.

**Tabla-3.Comparacion de pruebas bioquímicas, PCR y RapidCheck.**

N°Muestras	PCR Z.C	PR.BIOQ.*	PCR C.P	RapidCheck
97	(+)	(+)	(-)	(+)
13	(-)	*	(+)	(-)
27	(-)	*	(+)	(-)
46	(-)	(+)	(+)	(+)
28	(-)	(-)	(+)	(-)
29	(-)	(-)	(+)	(+)
69	(-)	(-)	(+)	(-)

PR.BIOQ: Pruebas bioquímicas.

Z.C: Zona confluyente

C.P: Colonias puras.

\*:Sospechosa de cepas *Arizonae* y *Diarizonae*.

-No se consideró relevante describir los resultados obtenidos de las 53 muestras restantes porque ninguna fue positiva ni por PCR ni por pruebas bioquímicas para *Salmonella* spp. y por lo tanto no se siguió con la caracterización microbiológica ya que no era el objetivo del trabajo.

## Discusión

En el presente estudio se realizó la amplificación del gen *invA*, uno de los genes descritos en todas las cepas septicémicas de *Salmonella* (Galán, 1991). Se utilizan dos pares de cebadores que amplifican un segmento específico en *Salmonella* spp, que replican satisfactoriamente los resultados que brinda la reacción de PCR, tales como especificidad y capacidad para procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo en comparación a los métodos tradicionales, como ya han sido descrito en una gran cantidad de estudios similares previos (Chen *et al.*, 1997; Malorny, 2004; Di Pinto *et al.*, 2007; Chacon *et al.*, 2010; Espinal Marin *et al.*, 2006).

El método microbiológico y el molecular pueden ser usados en el análisis de *Salmonella* spp. en este tipo de muestras, dejando abierta la posibilidad de la adopción de la metodología no convencional. Al momento de elegir la metodología, se evalúa una serie de aspectos como la inversión inicial, el costo operacional, la urgencia en la obtención de resultados, entre otros. Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella* spp. están ampliamente descritos, la detección de *Salmonella* spp. por cultivo convencional es considerada el método de referencia, sin embargo, esta técnica presenta desventajas como el tiempo para la obtención de un resultado (Chacon, 2010). Estas pruebas dependen de la expresión fenotípica de las características analizadas y pueden estar afectadas por variaciones en los medios de cultivo y en las condiciones de incubación. Como una alternativa se están introduciendo cada vez más los métodos moleculares; que permiten un diagnóstico más rápido y pueden ser más simples de realizar, pero tienen la desventaja que son mayores los costos (Caffer, 2008). Existen algunas limitaciones para la reproducibilidad de este estudio que deben considerarse si se quisiese aplicar el método en otros laboratorios. Se ha descrito que los resultados pueden variar de acuerdo con el termociclador que se emplee, ya sea por marca o incluso entre modelos de la misma marca (Reynisson, 2006), Para el caso de las muestras 13 y 27 podemos observar que si solo tenemos en cuenta la lectura de LIA, TSI y ONPG podríamos

dudar si es confirmatorio para *Salmonella*, pero al obtener un PCR positivo sugerimos que podría tratarse de las cepas *Arizonae* y *Diarizonae*. Estas cepas, presentan excepciones en las pruebas bioquímicas que podrían ser obvias para un microbiólogo con experiencia, pero no así para un novato en esta cuestión, dejando un margen amplio en el que entraría en juego la subjetividad de quien realiza la lectura.

Se ha descrito que la utilización de métodos rápido por inmunocromatografía pueden dar resultados negativos falsos. Esto se debe a que hay que tener en cuenta ciertos factores intrínsecos dependientes de la matriz alimentaria que podrían llevar a resultados erróneos. Por lo tanto la selección de un método rápido de detección de *Salmonella* spp. debe hacerse luego de determinar el grado de riesgo que se desea correr (Killner 2008). Se observó que en reses porcinas destinadas a consumo inmediato se pudo recuperar *Salmonella* spp. detectando gen *InvA* en 7 muestras de un total de 60. Este resultado demuestra la importancia de incorporar técnicas de diagnóstico que requieran menor tiempo a las que se establecen en las Normas ISO 6579:2002 del CAA, ya que el tiempo de detección por métodos moleculares fue menor y notablemente menos laborioso con respecto al tiempo requerido para realización de pruebas bioquímicas.

Económicamente el costo operativo para realización de la técnica por PCR fue mayor, teniendo en cuenta en primer lugar el costo inicial del equipamiento técnico que se requiere y sumando luego los reactivos utilizados durante la ejecución del ensayo.

La utilización de los discos O.N.P.G no presenta excepciones a la hora de mencionar ciertas limitaciones. Por un lado, se recomienda realizar en paralelo un control positivo y un control negativo; y por otro es necesario trabajar con un inóculo denso del microorganismo para incrementar la velocidad de la reacción.

## **Conclusión**

- La PCR fue positiva en todas aquellas muestras que detectaron *Salmonella* spp. por pruebas bioquímicas.
- La utilización de diferentes métodos para la identificación de *Salmonella* presenta variabilidad en los resultados obtenidos por cada uno.
- La inmunocromatografía requiere mayor concentración de *Salmonella* para obtener resultados fiables.
- Este trabajo demuestra la importancia de incorporar técnicas de diagnóstico que requieran menor tiempo a las que se establecen en las Normas ISO 6579:2002 del CAA, como los métodos moleculares, para obtener un diagnóstico de contaminación con rapidez y confiabilidad.

## Referencias bibliográficas

- Argüello H, Carvajal A, Collazos JA, García-Feliz C, Rubio P. (2012). Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*; 45: 905-912.
- Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, (1998). Revised 2000-July-18, Final Revision: 2001-Jan-25 Author: Peter Feng URL: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM309839.pdf> . (Fecha de consulta 25/09/2016)
- Baptista F, Alban L, Ersboll A, Nielsen L.(2009). Factors affecting persistence of high *Salmonella* serology in Danish pig herds. *Prev Vet Med*; 92:301-308. URL:[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000092&pid=S0121-3709201300010000700005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000092&pid=S0121-3709201300010000700005&lng=en)
- Benenson S, Raveh D, Schlesinger, Alberton J, Rudensky B, Hadas-Halpern I y Yinnon AM. (2001). The risk of vascular infection in adult patients with non Typhi *Salmonella* bacteriemia. *Am J Med*; p. 110:60-3.
- .Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2005). Second Edition. Popoff and Le Minor. Volume II, Editorial Board, p. 786.
- BIOHAZ. (2012). Scientific opinion on an estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in turkeys. *EFSA J*. 10: 2616.

- Caffer, M.; Terragno, R.; Binsztein, N. (2008). Manual de procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Disponible en el URL: [http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual\\_salmonella\\_2008.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_salmonella_2008.pdf) (Fecha de consulta: 13/08/2016).
- Chacón, L; Barrantes, K; García, C; Achí, R .(2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen invA de *Salmonella* spp. en lechuga. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 30, núm. 1, pp. 18-23
- Colello, R.; Etcheverría, A.; Padola, N. (2016). Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.C.P.B.A .
- Daum L, Barnes W, Mc Avin J, Neidert M, Cooper L, Huff W, et al. (2002). Real-Time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol* ;40:3050-2.
- Espinal Marin P, Prieto Suárez E, Otero Jiménez, V, Máttar Velilla S. (2006). Presencia del gen de invasividad inv A en cepas de *Salmonella* spp: aisladas de alimentos del Caribe Colombiano. *Revista Cubana de Salud Pública*, 32(2). Disponible en el URL: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662006000200004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662006000200004&lng=es&tlng=es).
- Frazier W. Westhoff D (1993). *Microbiología de los alimentos*. Edit. Acribia 4.a Edición Española.

- Galyov, E.E., Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Watson, P.R., Hedges, S., and Wallis, T.S. (1997). A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 25: 903–912.
- Gonzales-Barron UA, Redmond G, Butler F. (2012). A risk characterization model of *Salmonella* Typhimurium in Irish fresh pork sausages. *Food Research International*; 45: 1184–1193
- Hoorfar, J., N. Cook, B. Malorny, P. Rådström, D. Demedici, A. Abdulmawjood, y P. Fach., (2003). Internal Amplification Control for PCR Should Not Be Mandatory in the Clinical Medical Environment *J. Clin. Microbiol.* 41: 5835.
- Hoorfar, J., P. Ahrens, y P. Rådström. (2000). Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3429 - 3435.
- Hueck CJ. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.*; 62(2):379-433.
- Jawetz, Melnick, Adelberg (2010). *Microbiología médica 25a. edición. Enfermedades causadas por enterobacteriáceas diferentes a Salmonella y Shigella p.217.*
- Jay J., Loessner M., Golden D. *Microbiología moderna de los alimentos. Quinta edición. (2005). Capítulo 26 Gastroenteritis de origen alimentario causada por Salmonella y Shigella. p613-630*



- Jones B, Falkow S. (1996). Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol.* 14:533-61
- Killner M. (2008). Paralelos entre métodos fenotípicos, inmunológicos e genotípicos para detecção rápida de *Salmonella* spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso. Disponível em el URL:<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-07082008-074638/pt-br.php>. (Fecha de consulta: 28/09/2016).
- Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S, Papaconstantinou A, Dougan G, Baumler AJ. (2000). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: Identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun.* 2003;71:629–640  
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145368/>
- Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W. (1999). Diagnóstico microbiológico. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.; p. 2400.
- Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL. (2004). *Salmonella*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3rd Edition. Pp 143- 167. Blackwell Publishing
- Linder, E.(1995). Toxicología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España.; p53-65.
- Luigi, Teresita, Rojas, Legna, Valbuena, Oscar. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp. usando el gen *invAS* *Salus*. Disponível em: en:

- Malorny B, Bunge C, and Helmuth R. (2001). Evaluation of *Salmonella* spp. specific primer-sets for the validation within the Food PCR project Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, National Reference Laboratory for Salmonella, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Germany
- Malorny, B.; Hoofar, J.; Bunge, C.; Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl Environ Microbiol.* 69: p. 290-6.
- Malorny, B.; Hoofar, J.; Hugas, M.; Heuvelink, A.; Fach, P.; Ellerbroek, L.; Bunge, C.; Dorn, C.; Helmuth, R. (2005). Interlaboratory diagnostic accuracy. Federal Institute for Risk Assessment, Diedersdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany
- Martínez Álvarez N. (2007). Virulencia, Resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella Entérica*. Universidad de Oviedo. Departamento de biología funcional. Area Microbiología.
- Mejía W. (2003). Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis doctoral. Barcelona: Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. 99 p.
- Methner, U., N. Rammler, K. Fehlhaber, and U. Rosler, (2011). *Salmonella* status of pigs at slaughter-bacteriological and serological analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 15–20.

- Miller S, Pegues D. (2000). *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds.) *Mandell, Douglas, Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; p. 2344-2363.
- Patel J, Galán J.(2008). Investigating the function of Rho family GTPases during *Salmonella*/host cell interactions. *Methods Enzymol*; 439:145–158. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2677710/>
- Patel J, Galan J (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol.* 175:453–463. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2064522/>
- Pestka, James J.; Bondy (1990). Genevieve S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, vol. 68, no 7, p. 1009-1016.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio CCurtiss R, Gyles CL.(1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes*.Aug; 6(4):271-9.
- Rajic A., McFalla M, Deckertb A, Reid-Smithb, R, Cornelius Poppeb. Deweyc C, McEwenc S (2004). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. *Veterinary Microbiology* 104 189–196

- Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tükel C, Akçelik M, Bäumler AJ. (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun*. Jan; 74(1):19-27.
- Reynisson E, Josefsen R, Krause M, Hoorfar J. (2006). Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 66 206 – 216
- Rodríguez Sánchez, I; Barrera Saldaña, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7, 323-325.
- Salmon D., Smith T. (1886). The bacterium of swine plague. *American Monthly Microbiology Journal* 7; 204.
- Salyers A., Shoemaker N., Stevens A., Li L. Y. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59, 579–590
- Salyers A, Whitt D. (2002). *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. ASM press, Washington. Second edition; p 681-695.
- Vázquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC. (2000). Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 3; 287(5458):1655-8.
- Zhang, S., Santos, R.L., Tsolis, R.M., Stender, S., Hardt, W.D., Baumler, A.J., and Adams, L.G. (2002). The *Salmonella enterica* serotype

Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 70: 3843–3855.