

IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* SP MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADO (NESTED PCR) Y TÉCNICAS CONVENCIONALES EN HUEVOS RECOLECTADOS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE LA PAZ

ESPINOZA Edy¹; REVOLLO Susana¹; ESPADA Angélica²; ¹Laboratorio de Biología Molecular, Instituto SELADIS;

²Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Instituto SELADIS

* Correspondencia autor: edy_espinoz@hotmail.com.

RESUMEN

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial, siendo frecuentes los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados. El 2001 en Bolivia, del total de casos reportados a nivel nacional de infección por *Salmonella*, el 47% fueron positivos, de acuerdo al informe del Sistema Nacional de Información en Salud (SNIS), Servicio Departamental de Salud, Ministerio de Salud y Previsión Social. En el presente estudio se analizó 40 muestras de huevos procedente de diferentes mercados de la ciudad de La Paz mediante cultivos bacteriológicos y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado (Nested-PCR). Se identificó la sensibilidad y especificidad del método, comparada con la técnica convencional, para su posterior aplicación.

ABSTRACT

Salmonellosis is considered a disease of world distribution. Contaminated foods constitute the main source of infection. In 2001 in Bolivia, 47% of the reported cases were positive, according to the Sistema Nacional de Información en Salud (SNIS), Servicio Departamental de Salud, Ministerio de Salud y Previsión Social. In the present work samples consisted on forty eggs were analyzed, collected from different markets of La Paz city. The identification of *Salmonella* was established by bacteriological culture and Nested Polymerase chain reaction (Nested PCR). *Salmonella* sp was identified in 17.5 % of the studied samples by Nested PCR. This technique shows higher sensitivity, specificity and efficiency compared to the traditional bacteriological culture method.

Palabras Clave:

Nested PCR
Primer

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial, siendo frecuentes los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados o por diseminación proveniente de un portador desconocido. La infección por *salmonella* es un problema importante de salud pública, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. (3)

Según el informe mensual del SNIS (Sistema Nacional de Información en Salud) del SEDES (Servicio Departamental de Salud), en el ámbito urbano/rural de Bolivia, del total de casos reportados a nivel nacional de infección por *Salmonella*, el 47 % fueron positivos en el año 2001. (23)

Todas las *Salmonellas* deberían ser consideradas como potencialmente patógenas para el hombre. La única vía de entrada de estos microorganismos en el cuerpo humano es la oral, por lo que es de suma importancia el análisis de los alimentos. (13)

Los miembros del género *Salmonella* son los agentes causales de diferentes infecciones intestinales, entre éstas la salmonelosis humana, y pueden dividirse en los siguientes grupos: Las fiebres entéricas (fiebre tifoidea), bacteriemias en lesiones focales y enterocolitis o gastroenteritis. (6)

En una infección por alimentos debida a *Salmonella*, los síntomas sólo aparecen cuando el patógeno se multiplica en el intestino. Su período de incubación es variable según la especie, una vez ingerido el alimento. (5)

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares para el estudio del genoma de *Salmonella*. Los primeros resultados manifiestan la presencia de secuencias de inserción. Asimismo, estos



estudios han permitido diseñar primers específicos de estas regiones y poder, utilizarlos en la identificación específica de *Salmonella* a través de métodos de amplificación como ser la Reacción en Cadena de Polimerasa en (PCR). (8)

En el presente estudio se identificó *Salmonella* sp en huevos procedentes de diferentes mercados de la ciudad de La Paz, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidado o nested-PCR. De igual forma, se evaluó la sensibilidad y especificidad del método, comparada con la técnica convencional, para su posterior aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Control positivo

Se utilizó una cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, facilitada por el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; y cepas de *Salmonella* sp aisladas de muestras clínicas del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS). Se realizó la siembra de la cepas en medios de cultivo selectivos y diferenciales. Se aislaron colonias de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella* sp en fase estacionaria en agar S-S (agar *Salmonella-Shigella*), se realizó con la extracción de ADN de *Salmonella*.

Extracción

A los tubos Eppendorf se añadió PBS, se resuspendieron las colonias de *Salmonella*, se agitó, se centrifugó a 3000 rpm durante dos minutos, se retiró el sobrenadante y resuspendió con PBS: se centrifugó a 12000 r.p.m. por dos minutos. Se desechó el sobrenadante y resuspendió con agua estéril, se incubó a 100° C (en aceite para lograr llegar a esa temperatura), se mezcló por pipeteo, se centrifugó a 12000 rpm durante dos minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y congeló a 4°C. Al siguiente día, se descongelaron las muestras y se realizó la electroforesis.(25)

Optimización del Nested PCR

Posición y productos, producidos por los cebadores usados en la detección de *Salmonella* por PCR. (25)

PRIMERS	PARES DE BASES
BR-SalA	1124-1144 526
BR-SalB	1630-1650
BR-Sal IA	1280-1299 282
BR-Sal IB	1543-1562

Tabla 1. Posición de cebadores dentro de los 1,8Rb de la secuencia de ADN de salmonella (Tse et al. 1991)(25).

Se preparó una primera mezcla de reacción utilizando los primers BR-SalA y BR-SalB, para identificar las secuencias SEQ No.:1 y 2; y una segunda mezcla utilizando los primers BR-Sal IA y BR-Sal IB, para identificar las secuencias SEQ No.:3 y 4 (tabla 3). Los primers provienen del fragmento de 1.8 Kb HindIII de ADN cromosómico de *Salmonella typhimurium* (tabla 1). Se utilizó el ADN extraído de la cepa control (*Salmonella* sp), se preparó el master mix o mezcla de reactivos PCR (tabla 2). Se irradió con luz ultravioleta los materiales a utilizar; tips, gradillas, tubos, micropipetas, gorro, guantes y mangas. Se reconstituyó los primeros (tabla 3), para *Salmonella* sp, con agua estéril. Se diluyó los primers ya reconstituidos, también con agua estéril.

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL TUBO	VOLUMEN POR TUBO
Buffer 10X	10X	1X	2,5 ul
dNTPs	5 Mm	0,2 mM	1 ul
Primer 1	10 uM	0,4 uM	1 ul
Primer 2	10 uM	0,4 uM	1 ul
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5 mM
H ₂ O	-	-	14,375 uL
Taq	5U/ul	0,025 ul	0,125 ul

Tabla 2. Protocolo de preparación de Master Mix.

PRIMERS	SECUENCIAS
BR-SalA	5'-ACG GTT GTT TAG CCT GAT AC-3' SEQ. No.: 1
BR-SalB	5'-CTG GAT GAT ATG GAA GAA TG-3' SEQ. No.: 2
BR-Sal IA	5'-GTT CGG CAT TGT TAT TTC T-3' SEQ. No.: 3
BR-Sal IB	5'-CTC AGG GTC ATC GTT ATT C-3' SEQ. No.: 4

Tabla 3. Primers o cartillas para la detección e identificación de salmonellas y la secuencia de sus nucleótidos. (25)

PRIMER ROUND

Primers BRSalA y BRSalB	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min.	94 °C
35 ciclos	2 min.	94 °C
	20 seg.	57 °C
	1 min.	72 °C
Extensión final	7 min.	72 °C

SEGUNDO ROUND

Primers BRSal1A y BRSal1B	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min.	95 °C
20 ciclos	30 seg.	94 °C
	1 min.	54 °C
	1 min.	72 °C
Extensión final	5 min.	72 °C

Tabla 4. Temperaturas y tiempos de reacción de los primers del primer y segundo round utilizados en la técnica nested-PCR.

A la mezcla de reactivos PCR contenida en tubos PCR, se agregó las muestras y se amplificó en dos rounds en un termociclador (Termociclador PE 9600), previamente programado (tabla 4). Se reveló la electroforesis de ADN en transiluminador ultra violeta.

Optimización de extracción de ADN de *Salmonella* sp de muestras

Se marcaron los tubos, se añadió luego 700 µl de muestra y volumen igual de buffer de lisis (10 mM de tris, 10 mM de EDTA, 100 mM de NaCl y SDS 1%), 20 µl de proteinasa K, se mezcló, se incubó a 56°C durante cinco horas en Baño María con agitador, se centrifugó a 14000 rpm, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se añadió igual volumen de fenol cloroformo isoamílico, se centrifugó, se transfirió sobrenadante a otro tubo, se añadió igual volumen de solución SEVAG (cloroformo isoamílico 24:1), se mezcló, se centrifugó, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se añadió un décimo del volumen tomado de NaCl 3M, se agitó, y el doble de etanol absoluto frío, se dejó en reposo diez minutos, se centrifugó 15 minutos, se desechó el sobrenadante y secó a 60°C. Se realizó electroforesis. (25).

Aislamiento e identificación de *Salmonella* sp.

Se prepararon las muestras lavando los huevos con agua jabonosa, se enjuagó y sumergió en alcohol 70 % diez minutos, se extrajo el contenido a recipientes estériles, y se mezcló 25 µl de muestra en 225 µl de agua peptonada tamponada y se incubó a 35°C 24 horas. Se sembró en caldo tetratiónato y caldo Rappaport-Vassiliadis, incubó a 42°C 24 horas. Se sembró en agar *Salmonella-Shigella* y agar xilosa-lisina-desoxicolato, incubando durante a 35°C 24 horas. Se sembraron dos colonias en agar hierro triple azúcar, agar lisina hierro, SIM, caldo urea y agar citrato de Simmons.

Se utilizaron las mismas muestras y se extrajo ADN de la muestras, se amplificó las muestras de ADN extraído, se realizó la electroforesis y revelado.

RESULTADOS

Se logró extraer ADN de *Salmonella typhimurium* ATCC, 14028 y *Salmonella* sp, de las colonias aisladas en agar SS; ADN que fue utilizado como control positivo. Luego del revelado de la electroforesis del ADN extraído y amplificado, se obtuvieron bandas de ADN de 282



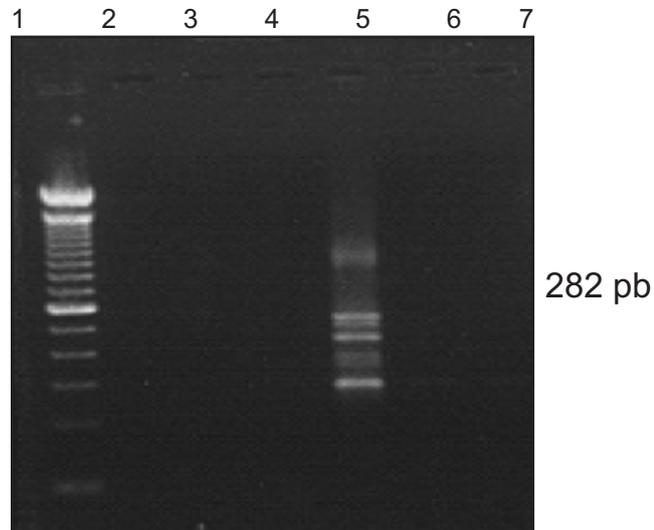


Figura 1. Fotografía de la electroforesis de ADN amplificado de las muestras, pozo 1 marcado de peso molecular, pozo 2 agua del cuarto blanco, pozo 3 agua del ambiente donde se realizó la extracción de ADN, pozo 4 control negativo, pozo 5 control positivo (*Salmonella sp*) y en los pozos 6 y 7 muestras

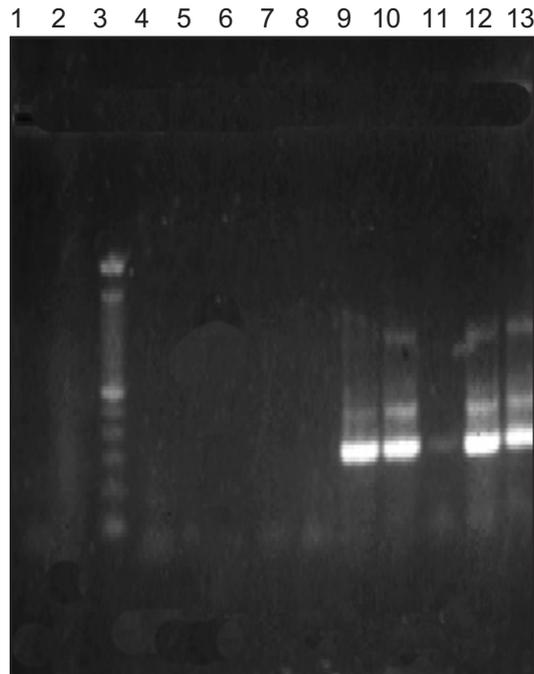


Figura 2. Fotografía de la corrida electroforética de ADN de las primeras muestras, se sembró en los pozos 1 y 2 ADN extraído, pozo 3 marcador de peso molecular, en los pozos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 ADN extraído de las muestras. Se observa bandas de 282 pb en la electroforesis de los pocillos 9, 10, 12 y 13.

pares de bases (figuras 1, 2 y 3), que corresponden a *Salmonella sp*, producto de los *primers* BRSa1A y BRSa1B. Los *primers* BRSaA y BRSaB actuaron en el primer round.

Como se observa en la figura 1, se sembró en el pocillo

1 marcador de peso molecular, en el pocillo 2 agua del cuarto blanco (donde se realiza el master mix), en el pocillo 3 agua del cuarto donde se realizó la extracción de ADN, en el pocillo 4 control negativo (*Shigella sp*), en el pocillo 5 control positivo (*Salmonella sp*) y en los pocillos 6 y 7 muestras de ADN extraído. Se puede

observar luego de electroforesis una banda de 282 pb (pares de bases) que corresponde al control positivo. Como se observa en la Figura 2, se sembró en el pocillo 1 y 2 ADN extraído de las muestras en el pocillo 3 marcador de peso molecular, en los pocillos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 ADN extraído de las muestras. Se observan en la electroforesis de los pocillos 9, 10 12 y 13, bandas de 282 pb.

Como se observa en la Figura 3, se sembró en el pocillo 1 agua del cuarto blanco, en el pocillo 2 agua del cuarto donde se realizó la extracción de ADN, en el pocillo 3 control negativo (ADN de *Shigella sp*), en los pocillos 13 y 19 marcador de peso molecular, en los pocillos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23 y 24 se sembró ADN extraído de las muestras, en los restantes pocillos no se sembró nada; también se observaron

bandas de 282 pb en la electroforesis de los pocillos 20, 21, 22 y 23.

DISCUSIÓN

Los métodos utilizados para detectar estos patógenos fueron diseñados inicialmente para las muestras clínicas, algunos organismos en muestras alimentarias no tienen suficiente tiempo para producir colonias visibles en el medio, el método utilizado, Nested PCR, puede detectar 10 UFC (unidades formadoras de colonias). (25) No se aisló *Salmonella sp* de cultivos, posiblemente por encontrarse en muy poca cantidad en los huevos para poder formar UFC.

Utilizando la técnica Nested PCR, se obtuvo los resultados, en el 17.5% de las muestras estudiadas, en la revelación

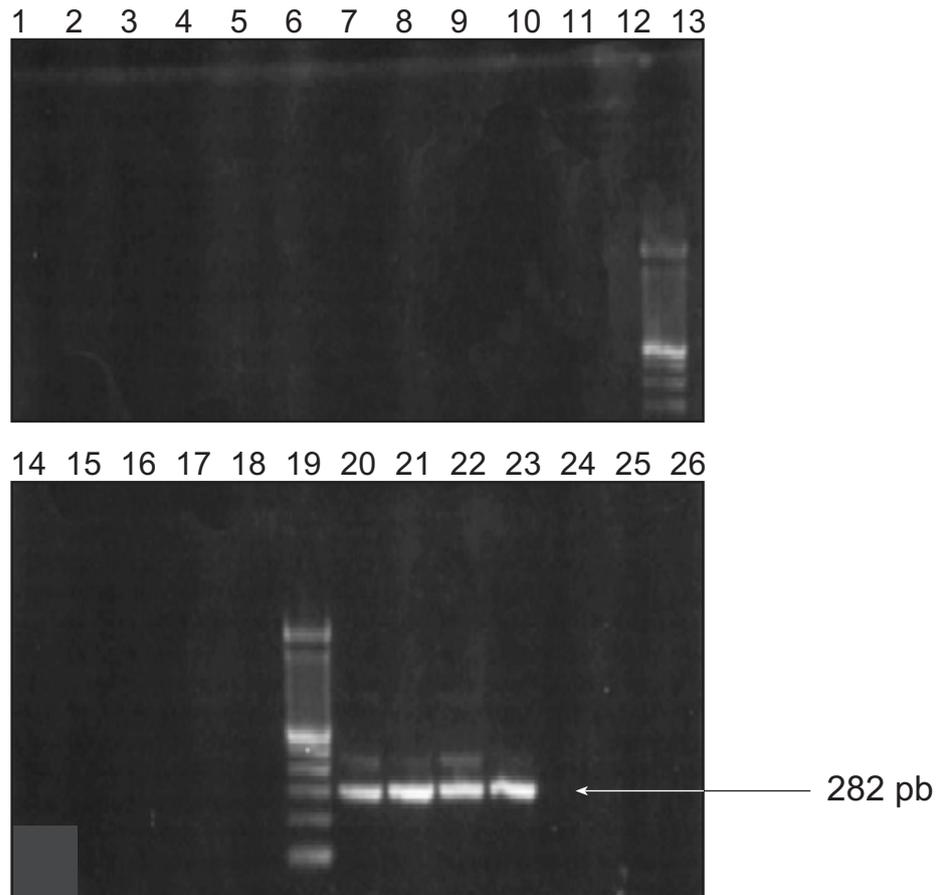


Figura 3. Fotografía de la electroforesis de ADN amplificado. Se sembró en el pozo 1 agua del cuarto blanco, en el pozo 2 agua del cuarto donde se realizó la extracción de ADN, en el pozo 3 control negativo (ADN de *Shigella sp*), en los pozos 13 y 19 marcador de peso molecular, en los restantes pozos se sembró ADN extraído de las muestras, en los pozos 25 y 26 no se sembró nada; se observó bandas de 282 pb en la electroforesis de los pozos 20, 21, 22 y 23.

de las corridas electroforéticas de las muestras de ADN extraídas. Se observa en las figuras 2 y 3; 8 muestras con bandas de 282 pb correspondientes a ADN de *Salmonella* sp.

La ventaja del uso de Nested PCR es la sensibilidad, ya que se utiliza una porción más pequeña de la muestra para obtener una amplificación específica y eficiente. (25) Este estudio podría demostrar que el uso de las técnicas moleculares, tendría una ventaja sobre las técnicas convencionales si hablamos de tiempo, sensibilidad y especificidad. Pudiendo así recomendar, esta técnica para la detección temprana de patógenos para el hombre. Si bien se requiere 10^5 bacterias de *Salmonella* para causar enfermedad, la sola presencia de *Salmonella* en los alimentos constituye un peligro para la salud.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS) por su apoyo a la investigación y en especial por el apoyo para este trabajo. Agradezco también al Dr. Giovanni García Rada y a los que participaron en la revisión y observaciones que fueron muy importantes para poder publicar este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreas, W., Manual of food quality control, 4 rev. Microbiological analysis, FAO, Washington, 1992, ISBN 92-5-10 3189-4.
- Astiasaran, Yciar, Alimentos composición y propiedades, 2000.
- Basualdo, Juan A., et al, Microbiología Biomédica, Ed. Atlante srl, Buenos Aires, ISBN 950-9539-30-9.
- Beller, Paloma, et al, Epidemiología de la salmonelosis no tifoidea en un hospital de Pontevedra, Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, vol.18 No 5, mayo 2000.
- Brock, Biología de los microorganismos, 8 edic., Ed. Prentice Hall, España, 1998.
- Brooks, Geo F, et al, Microbiología Médica de Jawetz, 21 a edic., Ed. El Manual Moderno; México D.F.; 1999, ISBN 968-426-810-6.
- CAE (1975) Capítulo XIV Huevos y derivados (3.14.00) Sección 1 huevos, Sección 2 derivados.
- Calva, Edmundo, et al, *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Chen, Wilfred, Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting salmonella, *Analytical Biochemistry*, 2000.
- Chin, James, et al, Publicación Científica y Técnica NO 581 El control de las enfermedades transmisibles, 17 edic., Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública, OPS.
- Frazier, W. C., et al, Microbiología de los alimentos, 4 edic. Ed. Acribia S.A., Zaragoza - España, 1993.
- Harris, Eva, et al, Low-cost approach to PCR: Appropriate transfer of biomolecular techniques, Ed. Oxford University Press Inc. Nueva York, 1998.
- ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Microorganismos de los alimentos 1: técnicas de análisis microbiológico, Ed. Acribia-Zaragoza, España.
- Juklick D., Wolfgang, Microbiología de Zinsser, 20 edic. Ed. Panamericana, 1994.
- Koneman, Elmer W., Diagnóstico Microbiológico, 5 edic., Ed. Panamericana, Buenos Aires, 1999, ISBN 950-06-1250-x.
- Mac Faddin, Jean F., et al, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Ed. Médica Panamericana, México, 1993, ISBN 968-7257-10-0.
- Nested PCR.
- Pascual A., Ma Del Rosario, Microbiología alimentaria, Ed. Diaz de Santos, S.A., Madrid, España, 1992, ISBN 84-7978-030-4.
- Rivas R., Virginia, Comparación de las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), ELISA y Latex en la detección de rotavirus en heces fecales de niños menores de 5 años, Tesina para optar al título de licenciatura en bioquímica, La Paz, Bolivia, 2001.

20. Ruiz, Montserrat, et al, Infecciones extraintestinales producido por serotipos no tifoideos de Salmonella, Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, vol. 18 No. 5, Mayo 2000.
21. Sánchez M., Rolando S., Guía de trabajos prácticos de biología molecular, 1 edic., La Paz, Bolivia, 1998.
22. SEDES (Ministerio de Salud), Informe mensual de Laboratorio. Salmonelosis, ámbito urbano/rural, 2001.
23. Spiegel, Murray R., et al, Estadística: serie Schaum, Ed. Mc Graw-Hill.
24. US575332: Detection and identification of Salmonella and Shigella, artículo de Internet.
26. Valle R., Fernando M., Obtención e identificación de perfiles genéticos de Mycobacterium tuberculosis mediante DRE-PCR y su aplicación e la epidemiología molecular de la tuberculosis, Tesis de grado para la licenciatura en Bioquímica, La Paz, Bolivia, 1999.

