

Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp. en canales porcinas

Different methods for isolation and detection of *Salmonella* spp. in pig carcasses

Ruiz, Maria Julia*; Ramallo, Grisel*; Colello, Rocío*; Villalobo, Cristina*; Monteavaro, Cristina*; Etcheverría, Analía*; Padola, Nora L.*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.71680

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define salmonelosis como una de las enfermedades transmitida por alimentos (ETA) de mayor casuística, ampliamente extendida en todo el mundo. La enfermedad es producida por *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 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 según Normas ISO 6579:2002 con algunas modificaciones, los métodos de inmunoensayo comerciales y la Reacción en Cadena de la Polimerasa técnica (PCR) de detección del gen *invA* implicado en el proceso de invasión de cepas patógenas. Se analizaron 60 muestras procedentes de canales porcinas destinadas a comercialización. Se detectó un 10% de *Salmonella* spp. Se pudo determinar 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 alta carga microbiana para un diagnóstico certero.

Palabras clave: *Salmonella* spp., PCR, Inmunocromatografía, Pruebas bioquímicas.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) defines salmonellosis as one of the most important foodborne diseases, widely spread worldwide. The disease is produced by *Salmonella* spp. and causes one of the most frequent zoonoses and of greater economic impact. The infection is acquired after ingestion of contaminated food, although it can also be transmitted from person to person or by fecal-oral route. Currently, conventional isolation microbiological techniques for detection of *Salmonella* spp. are established by the Argentine Food Code to verify the suitability of a product for consumption. But microbiological techniques require 4 to 5 days to obtain a result, time that plays against the producer and the conservation of such foods. For this reason in this work we analyze the traditional diagnostic methods according to ISO standards 6579: 2002 with some modifications, the commercial immunoassay methods and the Polymerase Chain Reaction technique (PCR) detection of the *invA* gene involved in the process of invasion of pathogenic strains. Sixty samples from pigs destined for commercialization were analyzed. 10% of *Salmonella* spp. was detected. It was possible to determine that the molecular diagnosis by PCR has high sensitivity, but it is not encouraging the result that reflect the commercial immunochromatographic tests since it is evident the need of high microbial load for a correct diagnosis.

Keywords: *Salmonella* spp., PCR, Immunochromatography, Biochemical tests

Recibido: diciembre 15 de 2017 **Aprobado:** octubre 18 de 2018

* Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. CIVETAN. CONICET. <https://orcid.org/0000-0002-8402-870X>. jruiz@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las ETA causadas por *Salmonella* spp. son de notificación obligatoria en Argentina (Art. 2, Ley 15.465) y en muchos Estados Miembros de la OMS, pero entre ellas se incluye únicamente la Fiebre Tifoidea y Paratifoidea, cuyos agentes etiológicos son *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, respectivamente. Por esta razón no se conocen cifras reales sobre el impacto de esta enfermedad en Argentina de casos de Salmonelosis no-tíficas. 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). 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, Terragno, & Binsztein, 2008).

Salmonella spp. está presente en cerdos siendo una importante fuente de infección para humanos. Puede 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 *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium* (Mejía Silva, i Castillo, de Antonio, & María, 2005). 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 vía 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 Rocio, 2016).

Actualmente hay 2.463 serotipos (serovares) de *Salmonella* (Rattanabattimong, 2007). Las fórmulas antigénicas de los serotipos de *Salmonella* son definidas y mantenidas por la OMS y el Centro Colaborador para Referencia e Investigación de *Salmonella* spp. en el Instituto Pasteur, París, Francia (colaborador de la OMS Centro).

Nuevos serotipos se enumeran en las actualizaciones anuales del esquema de Kauffmann-White.

Técnicas de detección de *Salmonella* spp.

La determinación de *Salmonella* spp. puede realizarse mediante diferentes métodos. Sin embargo, según la mayor parte de los estudios realizados, el cultivo microbiológico y las pruebas bioquímicas son los procedimientos más comúnmente utilizados para el aislamiento de la bacteria a partir de tejidos y materia fecal. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y es óptimo para todas las condiciones.

Es aconsejable apoyarse en los nuevos métodos de diagnóstico que están innovando para el aislamiento de *Salmonella* mediante el uso de pruebas moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) capaz de detectar un pequeño número de bacterias (10^2 a 10^4 UFC/ml) (Ward, Alinovi, Couëttil, & Wu, 2005).

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 PCR ha sido la principal herramienta diagnóstica. Los inicios de la PCR se remontan a 1971, cuando se 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 S.A. La PCR representa una valiosa alternativa para el estudio de los genes a nivel mundial, en *Salmonella* spp. puede utilizarse para amplificar el gen *invA*, factor de virulencia ligado a la invasión (Luigi, Rojas, & Valbuena, 2015). 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, entre otras. Estos factores se encuentran codificados en genes, localizados en el cromosoma o en plásmidos. Estos genes pueden estar en: islas de patogenicidad, 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 necesarias 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, son 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, Hoorfar, Bunge, & Hel-muth, 2003).

Otro método de diagnóstico utilizado, que permite obtener resultados rápidos de detección de *Salmonella* spp. es la técnica inmunocromatográfica. Se trata de una prueba cualitativa en la que la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos anti-Salmonella). Este complejo avanza por capilaridad a través de la membrana del test y en caso de ser positiva, se observa como una línea de color rojo en la zona de resultado de la membrana.

El objetivo de este estudio fue utilizar diferentes métodos moleculares, fenotípicos e inmunocromatográficos para la detección de *Salmonella* spp. en canales porcinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron esponjados de 60 canales porcinas, que posteriormente fueron cultivados en agua de peptona. Se conservó 1 ml de cada cultivo con glicerol a -70°C para futuros estudios.

Se realizó PCR para el gen *invA* de cada muestra directamente del cultivo 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*.

Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó según Normas ISO 6579:2002 con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajo una alícuota de cada muestra criopreservada y se cultivó en 3 ml de caldo Luria Bertani (LB) durante 24 h a 37°C. Se inoculó 1 ml del caldo LB en 9 ml de caldo Rappaport y se incubó a 42°C durante 24 h. Se sembró una alícuota del caldo Rappaport con ansa en anillo sobre la superficie del medio hasta agotar por estría en placas de agar *Salmonella-Shigella* (S-S) (Britania) y agar Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT₄) (Merck) incubándose por 37 °C durante 24h.

Se seleccionaron colonias típicas de *Salmonella* spp. y se cultivaron para ser confirmadas mediante pruebas bioquímicas y PCR.

Pruebas bioquímicas. Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para detección de *Salmonella* spp.: agar hierro tres azúcares (TSI) (Britania), agar lisina hierro (LIA) (Britania), urea (Britania), Fenilalanina-Desaminasa (FAD) (Britania), Orto-nitrofenilgalactopiranosido (O.N.P.G.).

Amplificación por PCR. Las colonias presuntivas a *Salmonella* obtenidas por los métodos fenotípicos convencionales se colocaron en 500 µl de agua bidestilada, llevándose a ebullición durante 10 min para liberación de ADN y posterior detección del gen *invA* por PCR.

Las cepas se conservaron a -70°C para sus futuras caracterizaciones.

Para la detección del gen se utilizó como control positivo la cepa *Salmonella* Dublín (*invA*⁺) 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%, MgCl₂ 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.

Las condiciones de termociclado empleadas en la detección del gen *invA* fueron las siguientes:

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 10 min.

La secuencia de *primers* empleados, tamaño de los productos amplificados y referencia bibliográfica se detallan en la tabla 1.

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

Tabla 1. Secuencia de *primers* del gen *invA*.

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

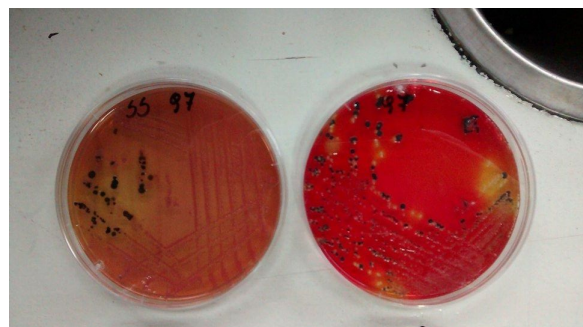


Figura 1. Colonias típicas de *Salmonella* spp. en medio S-S y XLT₄.

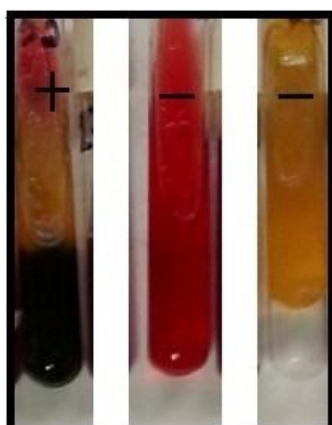


Figura 2. Interpretación para TSI.



Figura 3. Interpretación en medio LIA.

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.

Inmunocromatografía. Las muestras que dieron resultados positivos para PCR, ya sea directo de zona confluyente o a partir de colonias individuales, independientemente del resultado que se haya observado en las pruebas bioquímicas fueron sometidas a un test de inmunocromatografía (RapidCheck® SELECT).

RESULTADOS

De 60 muestras, una resultó positiva a *invA* por PCR directo de zona confluyente. Sin embargo, cuando se analizaron por PCR colonias compatibles con la morfología de *Salmonella* luego de sembrar las muestras en medios selectivos, se obtuvieron 6 aislamientos positivos al gen *invA* (10%).

De las 60 muestras, por pruebas bioquímicas se identificaron 5 aislamientos que fueron confirmadas como *Salmonella* spp., mientras que 2 aislamientos fueron clasificadas como sospechosas de *S. Arizonae* y *S. Diarizonae* ya que el O.N.P.G no dio resultado característico para *Salmonella* spp.

Se realizó Inmunocromatografía a las 7 muestras positivas por PCR y pruebas bioquímicas, y únicamente 3 manifestaron bandas de color en la prueba de cromatografía.

A continuación en la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos por pruebas bioquímicas.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado la prevalencia y seroprevalencia de *Salmonella* spp. en granjas porcinas, así como los factores de riesgo asociados a la presencia de la bacteria y la prevalencia en canales en las plantas de sacrificio y en expendios de carne porcina (Colello Rocio, 2016) (Gonzales-Barron, Redmond, & Butler, 2012) (Methner, Rammler, Fehlhaber, & Rösler, 2011). Estos estudios se centraron en la utilización de pruebas bioquímicas de identificación. Al momento de elegir la metodología, se evalúa una serie de aspectos como la inversión inicial, el costo operacional y la urgencia en la obtención de resultados, entre otros.

Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella* spp. están ampliamente descriptos y la detección de *Salmonella* spp. por cultivo convencional es considerada el método de referencia, sin embargo, esta técnica presenta como desventaja el tiempo requerido para la

Tabla 3. Comparación de pruebas bioquímicas, PCR e Inmunocromatografía.

Nºmuestra	PCR directo	PCR colonia	Prueba Bioquímica	Inmunocromatografía
97	+	-	+	+
13	-	+	*	-
27	-	+	*	-
46	-	+	+	+
28	-	+	+	-
29	-	+	+	+
69	-	+	+	-
Detección	1,67 %	10%	8,3 %	5%

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

obtención de un resultado (Chacón, Barrantes, García, & Achí, 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 alternativa se están utilizando cada vez más los métodos moleculares; que permiten un diagnóstico más rápido y simple de realizar (Caffer *et al.*, 2008), siendo la detección de positivos mayor por PCR que por pruebas bioquímicas (tabla 3). Por ejemplo, en las muestras 13 y 27, las pruebas bioquímicas dieron resultados dudosos para *Salmonella* spp., siendo confirmada como tal al obtener un resultado positivo para el gen *InvA* por PCR con primers específicos para *Salmonella* spp. 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.

La amplificación del gen *invA*, uno de los genes descritos en todas las cepas de *Salmonella* spp. se basa en la utilización de un par de *primers* que amplifican un segmento específico de *Salmonella* spp, como ya ha sido mencionado en estudios similares (Malorny *et al.*, 2003) (Chacón *et al.*, 2010) (Espinal Marin, Prieto Suárez, Otero Jiménez, & Máttar Velilla, 2006). De esta manera se obtienen resultados certeros que permitirían confirmar aquellos considerados dudosos mediante pruebas bioquímicas.

Se ha descrito que la utilización de métodos rápidos por inmunocromatografía puede dar resultados negativos falsos (tabla 3). Se deben 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).

La confirmación de colonias presuntivas (10%) de *Salmonella* spp. en 60 muestras demuestra la importancia de incorporar técnicas de diagnóstico que requieran menor tiempo a las que se establecen en las Normas, tales como ISO 6579:2002, ya que el tiempo de detección por métodos moleculares fue menor y notablemente menos laborioso con respecto al tiempo requerido para la realización de pruebas bioquímicas.

Económicamente el costo operativo para la 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. Sin embargo, el tiempo empleado para hacer la prueba y el tiempo que demora el resultado es menor que para los métodos microbiológicos tradicionales.

CONCLUSIÓN

La utilización de diferentes métodos para la identificación de *Salmonella* spp. presenta variabilidad en tiempo, recursos y, en algunos casos, en los resultados obtenidos por cada uno. Las pruebas bioquímicas implican mayor tiempo de obtención de resultados y gran cantidad de material y medios de cultivo. La inmunocromatografía requiere una concentración mayor de *Salmonella* spp. para obtener resultados fiables. Por lo tanto, resulta necesario incorporar técnicas de diagnóstico que requieran menor tiempo a las que se establecen en las Normas ISO 6579:2002, como los métodos moleculares, para obtener un diagnóstico de contaminación con rapidez y confiabilidad. La detección rápida ante la sospecha de *Salmonella* spp. es el aspecto central para disminuir la potencial contaminación y evitar que por

medio de los alimentos u otras vías llegue a la población y cause enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caffer, MI, Terragno, R, & Binsztein, N. (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. *Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO Global Salmonella Surv. para América del Sur.*
- Colello Rocio, Etcheverría Analía, Padola Nora Lia. (2016). *Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina.* UNCPBA, Argentina
- Chacón, Luz, Barrantes, Kenia, García, Cristina, & Achí, Rosario. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen invA de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 18-23.
- Espinal Marin, Paula, Prieto Suárez, Edgar, Otero Jiménez, Vanessa, & Máttar Velilla, Salim. (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), 0-0.
- Gonzales-Barron, UA, Redmond, G, & Butler, F. (2012). A risk characterization model of *Salmonella* Typhimurium in Irish fresh pork sausages. *Food Research International*, 45(2), 1184-1193.
- Hueck, Christoph J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 379-433.
- Killner, Mario. (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.* Universidade de São Paulo.
- Luigi, Teresita, Rojas, Legna, & Valbuena, Oscar. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp. usando el gen invA. *Salus*, 19(3).
- Malorny, Burkhard, Hoorfar, Jeffrey, Bunge, Cornelia, & Helmuth, Reiner. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 290-296.
- Mejía Silva, Willian José, i Castillo, Martín, de Antonio, Mateu, & María, Enrique. (2005). *Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección:* Universitat Autònoma de Barcelona.
- Methner, Ulrich, Rammler, Nadine, Fehlhaber, Karsten, & Rösler, Uwe. (2011). *Salmonella* status of pigs at slaughter—Bacteriological and serological analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 15-20.
- Rahn, K, De Grandis, SA, Clarke, RC, McEwen, SA, Galan, JE, Ginocchio, C, . . . Gyles, CL. (1992). Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes*, 6(4), 271-279.
- Rattanatabtimtong, Sukanya. (2007). Effects of Egg Yolk Antibodies on Weanling Pigs Challenged with *Pathogenic Salmonella Typhimurium*.
- Ward, Michael P, Alinovi, Catherine A, Couëttil, Laurent L, & Wu, Ching Ching. (2005). Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(2), 118-123.
- Zhang, Shuping, Santos, Renato L, Tsolis, Renee M, Stender, Silke, Hardt, Wolf-Dietrich, Bäumlner, Andreas J, & Adams, L Garry. (2002). The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and immunity*, 70(7), 3843-3855.