

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* AISLADA DE CUYES (*Cavia porcellus*) DE LOJA, ECUADOR.

Casart, Yveth ^{a,b,c*}; Falconí, Mercy ^a

^a AGROCALIDAD, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad – AGROCALIDAD, Laboratorio de Diagnóstico Animal, Km 14^{1/2} Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, Tumbaco, ECUADOR

^b Proyecto Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, Ecuador.

^c Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela.

Ingresado: 30/11/2015

Aceptado: 08/03/2016

Resumen

La Salmonelosis es una zoonosis de transmisión alimentaria de gran importancia a nivel mundial. Existen miles de serotipos del agente causal, la bacteria enterica *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Algunos serotipos tienen un amplio rango de hospederos, que incluye al ser humano; otros serotipos están restringidos a pocos huéspedes y algunos solo afectan a una especie en particular. La tipificación molecular busca identificar los serotipos de *Salmonella* sin necesidad de utilizar antisueros. En éste trabajo se evaluó la utilidad de un sistema de PCR múltiple para identificar el serotipo de colonias de *Salmonella* spp. aisladas a partir de órganos provenientes de cuyes, que presentaron sintomatología compatible con Salmonelosis. Los brotes de Salmonelosis ocurrieron en dos establecimientos de crianza familiar de cuyes ubicados en la Provincia de Loja. Colonias con morfología y bioquímica compatible con *Salmonella* spp. fueron aisladas a partir de intestino, colon, bazo e hígado, resultado que concuerda con la naturaleza septicémica de la Salmonelosis en cuyes. Todas las muestras evaluadas exhibieron el patrón de bandas correspondiente a *Salmonella* ser. Typhimurium, resultado que fue confirmado por serotipificación. Se discuten las ventajas de la tipificación molecular sobre el método de serotipificación convencional.

Palabras clave: cobayo, PCR múltiple, salmonelosis, serotipo, Typhimurium.

MOLECULAR TYPING OF *Salmonella* ISOLATED FROM GUINEA PIGS (*Cavia porcellus*) IN LOJA, ECUADOR.

Abstract

Salmonellosis is a food borne zoonotic disease of primary concern globally. There are thousands of serotypes of the causative agent, the enteric bacteria *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Some serotypes have a broad host range, that include humans; others serotypes are host-restricted and some are species-specific. Molecular typing seeks to identify *Salmonella* serotypes without using antisera. In this work, the usefulness of a multiplex PCR system to identify the serotype of *Salmonella* spp., isolated from organs of guinea pigs with symptomatology compatible with Salmonellosis, was evaluated. The Salmonellosis outbreaks occurred in two farms where guinea pigs were bred under a familiar-system in the Province of Loja. Colonies with typical morphology and biochemistry for *Salmonella* spp. were isolated from intestine, colon, spleen and liver, a result compatible with the septicemic nature of salmonellosis in guinea pigs. All samples tested exhibited the band pattern corresponding to *Salmonella* ser. Typhimurium, a result that was confirmed by serotyping. The advantages of the molecular typing system compared to the conventional serotyping method are discussed.

Keywords: guinea pig, multiplex PCR, salmonellosis, serotype, Typhimurium.

* Casart, Yveth. AGROCALIDAD. Laboratorios de Diagnóstico Animal, Km 14 ½ Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, Tumbaco, Ecuador. Teléfono: +(593) 2 2372844, Ext. 223. e-mail: yvethcasart@yahoo.com

I INTRODUCCIÓN

La Salmonelosis es una importante zoonosis causada por enterobacterias del género *Salmonella*. Siendo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* la que se aísla con mayor frecuencia en animales de sangre caliente, de la cual se han descrito más de 1.500 serotipos. Los serotipos son grupos de individuos dentro de una misma especie o subespecie que presentan estructuras antigénicas comunes. La identificación del serotipo se realiza mediante el uso de antisueros que reconocen los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). [1] Sin embargo, se han desarrollado métodos de tipificación molecular para identificar algunos de los serotipos más comunes a través del uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). [2, 3]

El cuy, cobayo o curí (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú; ha sido explotado en cautiverio en muchos países latinoamericanos, donde constituye una fuente alimenticia y económica importante. [4] Los cuyes son muy susceptibles a la Salmonelosis; infección que tanto en la forma aguda como crónica ocasiona elevada mortalidad y morbilidad en estas poblaciones. [4, 5, 6] En las colonias de cobayos de laboratorio, *Salmonella* ser. Typhimurium es el serotipo más común; también han sido reportados los serotipos *Salmonella* ser. Enteritidis, *Salmonella* ser. Weltevreden y *Salmonella* ser. Poona. [7, 8] La infección se relaciona con estrés, malas prácticas de manejo y niveles deficientes de bioseguridad, como la presencia de roedores y aves, y el ingreso no controlado del personal que favorece la contaminación de ambientes y alimentos. [4, 5] Las variaciones de temperatura y humedad también son predisponentes. [9]

Los signos clínicos de la Salmonelosis en cobayos incluyen: debilidad, anorexia, abdomen inflamado, pelo hirsuto, diarrea, abortos, infertilidad, parálisis de las extremidades posteriores y caquexia. [10] El diagnóstico de la enfermedad se hace mediante el aislamiento e identificación de la bacteria. En los animales sintomáticos, la bacteria *Salmonella enterica* se aísla con mayor frecuencia a partir del bazo e hígado. [10] Los animales que se recuperan de la infección pueden convertirse en portadores, eliminando salmonelas intermitentemente en las heces.

A pesar del impacto de la Salmonelosis en la cría de cuyes y del riesgo que representa para la salud pública, son muy pocos los artículos donde se reporta el serotipo de *Salmonella* aislado en ésta especie y en la mayoría de los casos se trata de animales de laboratorio. En el presente trabajo se evaluó un sistema de tipificación

molecular basado en PCR múltiple (PCRm) para identificar el serotipo de *Salmonella* spp. aisladas a partir de órganos de cuyes con sintomatología compatible con Salmonelosis, provenientes de establecimientos de crianza familiar.

II METODOLOGÍA

Cepas Bacterianas

La cepa de referencia *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC® 14028™) se utilizó como control positivo. Las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de órganos de *C. porcellus*, se obtuvieron a partir del: colon, bazo e hígado de uno de los dos animales enfermos, que fueron sacrificados y necropsiados en el Predio A; y a partir bazo, hígado e intestino de uno de los tres animales enfermos que fueron sacrificados y necropsiados en el Predio B. Los animales fueron sacrificados y necropsiados como resultado de inspecciones hechas a dos establecimientos de explotación familiar por los técnicos responsables de la vigilancia pasiva.

Métodos Microbiológicos

Los órganos de los animales sintomáticos fueron procesados de acuerdo al siguiente esquema: pre-enriquecimiento en Agua Peptonada, por 24 horas a 35 ± 2 °C; enriquecimiento selectivo durante 24 horas, en Caldo Tetratonato a 35 ± 2 °C y Caldo Rappaport -Vasiliadis a 42 ± 2 °C; y crecimiento en los medios selectivos Agar Enterico Hektoen, Agar Rojo-Violeta y Agar Bismuto Sulfito, durante 24 horas a 35 ± 2 °C. Las colonias que exhibieron la morfología característica para los miembros del género *Salmonella*, fueron analizadas con las pruebas bioquímicas en Agar TSI, Agar LIA, Agar MIO y Agar Urea; y conservadas para su tipificación molecular. Todos los medios de cultivo utilizados fueron de la marca Difco™ (BD, EEUU).

Extracción de ADN

El ADN genómico bacteriano se obtuvo siguiendo el método descrito por Akiba *et al.* [3] Brevemente, una colonia de cada aislamiento bacteriano a evaluar se resuspendió en 50 µl de NaOH 25 mM. Esta suspensión se hirvió por 5 min y se dejó enfriar. Luego, se le agregaron 8 µl de Tris-HCl 0,5 M (pH=8,0) y se centrifugó a 13 000 xg por 10 min; 5 µl del sobrenadante se utilizaron como molde para la PCRm.

PCR Múltiple (PCRm)

Para la PCRm se utilizaron los iniciadores correspondientes a uno de los siete sistemas diseñados por Akiba *et al.* [3]; específicamente el sistema que permite identificar *Salmonella enterica* ser.

Typhimurium. Cada uno de estos sistemas amplifica tres regiones "serotipo específicas", generando amplicones de ≈100 pb, ≈200 pb, ≈300 pb y una banda de 605 pb que sirve como control interno de amplificación. La banda de 605 pb corresponde a una región del gen *invA* específica para el género *Salmonella*, los otros tres amplicones serán amplificados solo si la cepa evaluada pertenece al serotipo para el cual fue diseñado. [3] Los iniciadores utilizados fueron: TMP1F, TMP1R; TMP2F, TMP2R; TMP3F, TMP3R e *invAF*, *invAR*; los cuales amplifican productos de 94 pb, 196 pb, 303 pb y 605 pb, respectivamente. [3] La reacción de PCRm se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenían: 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brasil), 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂ y las concentraciones de iniciadores recomendadas por Gole *et al.* [11]: 0,5 µM de los iniciadores *invAF*, *invAR*, TMP2F y TMP2R y 0,3 µM de los iniciadores TMP1F, TMP1R, TMP3F y TMP3R. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador T100™ (BIORAD), con una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C por 15 s; hibridación a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s), y una extensión final a 72 °C por 10 min. Finalmente, 10 µl de los productos del PCRm fueron separados en gel de agarosa al 2% en Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X, en presencia de SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización y fotografía se hizo con el sistema Mini Lumi (Bio-Imaging, Major Science).

Serotipificación

Para la serotipificación se utilizaron Antisueros Salmonella O Difco™ y Antisueros Salmonella H Difco™ (BD, EEUU), siguiendo las recomendaciones para aglutinación en placa y pruebas en tubo de Caffer *et al.* [12], ajustándolas a las instrucciones del fabricante de los antisueros. Una vez identificados los antígenos O y H de los aislados, la determinación del serotipo se hizo en base al esquema de Kauffman-White-Le Minor. [1]

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hallazgos Generales

En ambos predios se efectúa la crianza familiar de cuyes y los mismos se encuentran ubicados en la Provincia de Loja, en las Parroquias de Chantaco y Catamayo, respectivamente. En el Predio A se reportaron dos animales enfermos, de un total de 280. Estos animales presentaron caquexia, inapetencia, deshidratación; durante la necropsia se observó: pericarditis, quistes blanquecinos en el parénquima del hígado, ascitis y tracto gastrointestinal congestionado. En éste establecimiento, los galpones presentaron un

alto grado de humedad al momento de la inspección. En el Predio B se reportaron tres animales enfermos y 95 muertos, de un total de 300 animales; se observó fiebre, decaimiento, anorexia, pelo erizado, deshidratación, abdomen abultado; se observaron tumoraciones a nivel del hígado, bazo e intestinos durante la necropsia. El propietario del Predio B señaló que los animales muertos antes de la inspección presentaban edemas pustulosos en la garganta.

La mayoría de los signos presentados por los animales evaluados son compatibles con los reportados para la Salmonelosis en *C. porcellus*. [10] Como posible origen de la enfermedad se señaló el uso de estiércol de gallina, sin tratamiento previo, como abono para los pastizales que sirven de alimento a los cuyes. Los excrementos de aves de corral son un reservorio para varios agentes causantes de zoonosis, incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens*. [13]

Hallazgos Microbiológicos

Para el Predio A, se aislaron colonias compatibles morfológica y bioquímicamente con *Salmonella* spp. a partir de colon, bazo e hígado de una hembra de 5 meses de edad. Para el predio B, se aislaron colonias con morfología y bioquímica compatible para *Salmonella* spp. a partir de intestino, bazo e hígado de una hembra de 4 meses de edad. Los resultados de las pruebas bioquímicas para todos los aislados fueron positivas para producción de gas y H₂S, movilidad, ornitina descarboxilasa, descarboxilación de lisina, citrato (24 h) y negativos para fermentación de lactosa, indol y urea. Sin embargo, para el Predio B, las colonias tipificadas molecularmente corresponden únicamente a los aislamientos hechos a partir del intestino. El aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de bazo, hígado e intestinos de animales sintomáticos concuerda con las manifestaciones sistémicas de ésta infección y con otros resultados en la literatura. [6, 9, 10]

Tipificación Molecular y Serotipificación

Se evaluaron un total de cinco aislados de *Salmonella* spp., tres aislados del Predio A y dos aislados del Predio B. Los cinco aislamientos evaluados exhibieron el patrón esperado para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, observándose para todas las muestras los amplicones de 94 pb, 196 pb, 303 pb y 605 pb característicos de éste serotipo al utilizar el sistema de PCRm desarrollado por Akiba *et al.* [3], como se muestra en la Fig. 1. Estos resultados fueron confirmados utilizando el esquema de serotipificación tradicional, ya que la evaluación de los aislados arrojó la fórmula antigénica: 4,12:i:1,2; correspondiente al serotipo Typhimurium. [1]

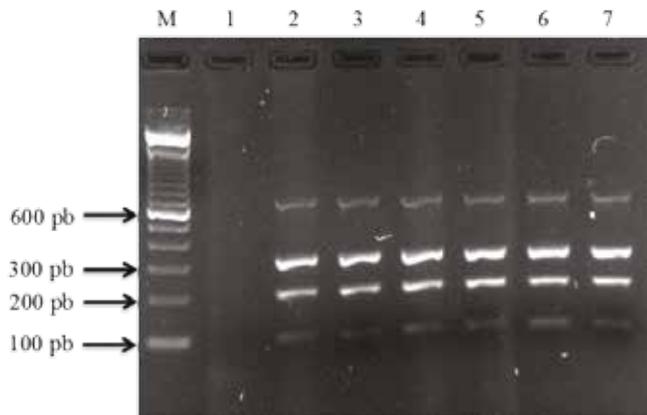


Figura 1. Tipificación molecular de *Salmonella* spp. M) marcador de peso molecular TrackIt™ 100 pb DNA ladder (Invitrogen), 1) Control negativo (H_2O), 2) *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028™, 3-7): Aislados de cuyes. Predio A: 3) Colon, 4) Bazo, 5) Hígado. Predio B: 6) Intestino (1), 7) Intestino (2). Gel de agarosa al 2%.

Cabe destacar, que una vez obtenidas las colonias purificadas de *Salmonella* spp., la identificación del serotipo utilizando el sistema de PCRm se logró el mismo día del análisis, mientras que para identificar los antígenos O, H1 y H2, utilizando la serotipificación convencional, se necesitaron 3 días. Los sistemas de tipificación molecular basados en PCR múltiple constituyen una alternativa rápida, específica, segura y relativamente fácil de implementar, para evaluar los serotipos de *Salmonella* spp. [2] Se han desarrollado numerosos sistemas, muchos de ellos tienen como diana los genes que codifican para los antígenos evaluados por la serotipificación tradicional y otros están basados en la amplificación de regiones “serotipo específicas”. Los sistemas de PCRm desarrollados por Akiba *et al.* [3] pertenecen a éste segundo grupo y están diseñados para identificar siete de los serotipos más comunes, incluyendo Typhimurium y Enteritidis, que son los que han sido asociados con mayor frecuencia a los casos de Salmonelosis en cuyes. [6, 7, 8] Razón por la cual se seleccionaron estos sistemas para evaluar las colonias de *Salmonella* spp. aisladas en éste trabajo.

El serotipo Typhimurium es ubicuo y capaz de provocar Salmonelosis en un amplio rango de hospederos, el cual incluye a la especie humana. Se han reportado brotes de Salmonelosis humana asociados al consumo de carne de cuy en Massachusetts, EEUU; entre los años 2006-2009, los serotipos implicados como responsables fueron: *Salmonella* Grupo B: S.I 4,12:i,- ; *Salmonella* ser. Typhimurium y *Salmonella* ser. Typhimurium O:5-. [8] Sería interesante evaluar la prevalencia de los diferentes serotipos de *Salmonella* en los establecimientos de crianza de cuyes del Ecuador, para lo cual se podrían emplear sistemas

basados en PCRm, como el utilizado en éste trabajo, que resultan más rápidos y fáciles de implementar, que el esquema de serotipificación tradicional.

IV CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la tipificación molecular, utilizando PCRm, es una herramienta rápida, confiable y fácil de implementar. Adicionalmente, estos sistemas pueden ser utilizados en laboratorios que no cuenten con los costosos antisueros o con la experiencia necesaria para realizar la serotipificación tradicional, pero que estén equipados con los elementos básicos necesarios para realizar la técnica de PCR.

Las técnicas de tipificación molecular y de serotipificación coincidieron en clasificar dentro del serotipo Typhimurium a todos los aislados de *S. enterica* subsp. *enterica*, obtenidos a partir de órganos de cuyes enfermos que fueron sacrificados y necropsiados durante dos brotes de Salmonelosis, ocurridos en establecimientos de crianza familiar, de la Provincia de Loja.

La presencia de *Salmonella* ser. Typhimurium en establecimientos de crianza de cuyes representa un riesgo tanto para la salud de estos animales, como para la salud pública, debido a la virulencia y amplio rango de hospederos de éste serotipo.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a María S. Chamba por la recolección de las muestras. A AGROCALIDAD por el apoyo financiero y logístico. YC agradece muy especialmente al Proyecto Prometeo, de la SENESCYT, Ecuador, por haberle otorgado una beca de investigación.

Referencias

- [1] P. A. D. Grimont, F.-X. Weill (2007) “Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars”. 9ª ed. Paris, Francia, Institut Pasteur. pp. 1-166.
- [2] M. Elbagir, K. Lin (2010) “Differentiation of *Salmonella enterica* based on PCR detection of selected somatic and flagellar antigens”. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4(9), 871-876.
- [3] M. Akiba, M. Kusumoto, T. Iwata (2011) “Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR”, *J Microbiol. Meth.* 85(1), 9-15.
- [4] L. Chauca (1997) “Producción de cuyes (*Cavia porcellus*)”. Roma, Italia, Organización de las Naciones

Unidas para la Agricultura y la Alimentación-FAO, pp. 1-121.

[5] C. Onyekaba (1983) "Clinical salmonellosis in a guineapig colony caused by a new *Salmonella* serotype, *Salmonella ochiogu*". *Lab. Anim.* 17(3), 213-216.

[6] A. Layme, R. Perales, A. Chavera, C. Gavidia, S. Calle (2011) "Lesiones anatomopatológicas en cuyes (*Cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* sp. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 22(4), 369-376.

[7] S. Coutinho, L. da Silva, I. Sinhorini, V. de Carvalho, E. da Costa (1994) "Surtos de salmonelose (*Salmonella typhimurium*) em *Cavia porcellus*". *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 31(3/4), 233-237.

[8] J. Fournier, K. Knox, M. Harris, M. Newstein "Family outbreaks of nontyphoidal Salmonellosis following a meal of guinea pigs". *Case Rep. Infect. Dis.* doi.org/10.1155/2015/864640

[9] I. Ramírez (1972) "Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*)". Tesis de Médico Veterinario. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

[10] A. Matsuura, S. Morales, S. Calle, M. Ara (2010) "Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash". *Rev. Inv. Vet. Perú*, 21(1), 93-99.

[11] V. C. Gole, V. Torok, M. Sexton, C. G. Caraguel, K. K. Chousalkar (2014) "Association between indoor environmental contamination by *Salmonella enterica* and contamination of eggs on layer farms". *J. Clin. Microbiol.* 52(9), 3250-3258.

[12] M. I. Caffer, R. Terragno, N. Binsztein. 2008. Manual de procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina, pp. 42-56.

[13] N. S. Bolan, A. A. Szogi, T. Chuasavathi, B. Seshadri, M. J. Rothrock, P. Panneerselvam (2010) "Uses and management of poultry litter". *Worlds Poult. Sci. J.* 66(4), 673-698.