

ARTÍCULO OPINIÓN

Métodos de tipificación basados en PCR para diferenciación de aislados de *Salmonella*

¿Es posible identificar serotipos bacterianos sin utilizar antisueros? Existen métodos de “serotipificación molecular”, o métodos de tipificación basados en ADN, cuyo objetivo es identificar serotipos sin tener que utilizar antisueros. *Salmonella* es uno de los géneros bacterianos para los cuales la tipificación molecular busca, entre otras cosas, generar información comparable con la obtenida por el método de serotipificación tradicional.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos entéricos, gramnegativos, anaerobios facultativos, entre los cuales se encuentran los agentes causales de la Salmonelosis. La Salmonelosis es una de las enteritis bacterianas zoonóticas más comunes y de alto impacto económico. Además de colonizar el intestino, las salmonelas están ampliamente distribuidas en el ambiente, encontrándose con frecuencia en vertidos de granjas, aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal. Las bacterias del género *Salmonella* pueden encontrarse también en el pienso, provocando el transporte gastrointestinal asintomático o enfermedades infecciosas particularmente en aves, terneros y en cerdos. Los signos clínicos más frecuentes son los entéricos, pero se puede observar: septicemia aguda, aborto, artritis y enfermedad respiratoria.

El género *Salmonella* está conformado por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La especie *S. enterica* comprende 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI); siendo *S. enterica* subsp. *enterica* (I) comúnmente aislada a partir de humanos y animales de sangre caliente y la que se aísla con mayor frecuencia (99,5%) en laboratorios clínicos. Las otras subespecies y *S. bongori* suelen aislarse a partir de muestra ambientales y de reptiles. Las subespecies pueden ser divididas en serotipos en base a las diferencias en los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y de la cápsula (Vi). Se han identificado más de 2.500 serotipos de *Salmonella*. La mayoría de los

serotipos, unos 1.500, pertenecen a la subespecie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) y recibieron nombres como Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, etc., mientras que los serotipos que pertenecen a otras subespecies han sido identificados con números de acuerdo a su fórmula antigénica. El diagnóstico de la Salmonelosis se basa en el aislamiento del microorganismo a partir de tejidos obtenidos en necropsias o de las heces, proceso que requiere de pasos de pre-enriquecimiento, enriquecimiento con inhibidores de la microbiota asociada y medios selectivos para diferenciar *Salmonella spp.* de otras enterobacterias. Sin embargo, la confirmación definitiva de la especie y el serotipo aislado requiere de la aplicación de varias pruebas bioquímicas, serológicas y/o moleculares a partir de los cultivos puros. El método de serotipificación, basado en las reacciones de aglutinación de la cepa evaluada con antisueros específicos contra los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), denominado esquema Kauffman White, requiere: más de 150 antisueros específicos, 2 a 3 días para el análisis y personal muy bien entrenado, lo cual lo hace costoso y tedioso. Sin embargo, es uno de los métodos de referencia para la clasificación actual de los serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

En la búsqueda de un método rápido, robusto, sensible, capaz de diferenciar cepas que no estén relacionadas epidemiológicamente y de asociar los aislados que provengan de la misma fuente, sin alejarse de la clasificación actual de *Salmonella* en subespecies y serotipos, se han desarrollado métodos de tipificación molecular basados en PCR múltiple. La mayoría de los sistemas de tipificación por PCR múltiple tienen como diana los genes que codifican para los antígenos evaluados por la serotipificación tradicional, es decir, los genes del grupo *rfb*, *wzx*, *tyv*, *fliB*, *fliC*, *fljB*, *viaA* y *viaB*; por ser estos los que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de los antígenos O, los que codifican para la flagelina o los genes responsables de la síntesis del antígeno capsular Vi. La búsqueda en las bases de datos de secuencias “serotipo específicas”, es decir, que están presentes exclusivamente en el genoma de alguno de los serotipos, también ha sido utilizada como estrategia para el diseño de sistemas de tipificación basados en PCR. Hasta la fecha, no existen métodos de tipificación basados en PCR que permitan discriminar entre los 1.500 serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I). Sin embargo, existen protocolos para tipificar los serotipos más comunes. Dependiendo del origen de las cepas de *Salmonella* a evaluar, se puede

seleccionar el método de tipificación por PCR más adecuado para los serotipos que se encuentran asociados, con mayor frecuencia, a la especie hospedera de interés, la muestra ambiental, materia prima o alimento que se esté analizando. Aunque la mayoría de los serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) tienen la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de una amplia gama de animales, incluyendo humanos y aves, unos pocos tienen predilección por una o pocas especies hospedadoras. Debido a su preferencia de hospedadores, los serotipos pueden dividirse en tres grupos: 1. Serotipos huésped específico (*S. Gallinarum*, en aves; *S. Abortusequi*, en caballos), 2. Serotipos huésped restringidos (*S. Choleraesuis*, en cerdos y humanos; *S. Dublin*, en bovinos y humanos) y 3. Serotipos con amplio espectro de hospederos (*S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*).

Los resultados obtenidos con sistemas de PCR múltiple han demostrado ser particularmente útiles en laboratorios que carecen de una infraestructura de serotipificación completa, son rápidos, específicos y seguros para muchos serotipos de *Salmonella*. Sin embargo, varios investigadores han concluido que los métodos basados en ADN aún no pueden sustituir completamente al método tradicional. Por lo que recomiendan el uso de la tipificación por PCR múltiple para los serotipos más comunes y la identificación por el método de serotipificación tradicional para los otros casos. En base a las ventajas que ofrecen los sistemas de tipificación molecular por PCR múltiple, se está implementando en AGROCALIDAD un sistema que permite identificar los serotipos *Choleraesuis*, *Enteritidis*, *Thyphimurium*, *Hadar*, *Infantis* y *Gallinarum* para evaluar aislados de *Salmonella spp.* provenientes de ganado porcino y aves de corral.

Agradecimiento

Mi agradecimiento al Proyecto Prometeo, de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador, por otorgarme una beca de investigación. Agradezco también a AGROCALIDAD por el apoyo e interés en que se cumplan los objetivos planteados.

Yveth Casart Quintero

Investigadora Prometeo - SENESCYT
Laboratorio de Diagnóstico Animal
Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento
de Calidad del Agro - AGROCALIDAD



Dra. Yveth Casart Quintero, PhD

Se graduó de Licenciada en Biología, Cum Laude, en la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela, en 1996. Poco después ingresó al postgrado del Instituto

Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), obteniendo el título de Doctora en Ciencias, Mención: Microbiología, en el 2003. En su tesis doctoral se caracterizaron dos genes involucrados en la segregación del cromosoma micobacteriano. De inmediato ingresó como Postdoctorante en el Laboratorio de Biología Molecular del IVIC, trabajando en la evaluación del efecto de secuencias de inserción en el origen de replicación de *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro* y en un modelo murino; en paralelo con las investigaciones sobre la segregación del cromosoma del bacilo tuberculoso. El último año de postdoctorado lo realizó en el Lab. de Microbiología del Instituto de Glicómica, Universidad de Griffith, Australia; durante el cual construyó, por ingeniería genética, una cepa bioluminiscente (emisora de luz) de *Burkholderia pseudomallei*, a ser utilizada para estudiar las rutas de infección en un modelo de ratones. A su regreso ingresó como investigadora del IVIC, siendo jefa encargada del laboratorio por 2 años, dirigiendo tesis de pre y postgrado. Desde Abril del 2009, se desempeña como Profesora Tiempo Completo en la Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, en la Universidad Central de Venezuela y es profesora invitada en varios postgrados. Ha participado en numerosos congresos científicos, cursos y pasantías internacionales y publicado 11 trabajos en revistas internacionales. Como Investigadora del Proyecto Prometeo en AGROCALIDAD, participa en proyectos de tipificación molecular bacteriana y asesora en la implementación de técnicas de diagnóstico convencional y molecular de zoonosis bacterianas.