

Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp. usando el gen invA

Teresita Luigi^{1,4}, Legna Rojas², Oscar Valbuena^{3,4}

RESUMEN

Se desarrolló un protocolo de PCR para identificar cepas de *Salmonella* de diferentes procedencias empleando un set de iniciadores PCR específico a *Salmonella*, para el reconocimiento de una secuencia de 119 pb del gen invA. Los resultados cumplieron con las máximas de la selectividad: inclusividad, pues todas las 14 cepas de *Salmonella* ensayadas presentaron señal positiva para el gen, exclusividad ya que ninguna cepa no *Salmonella* (*Shigella*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7) mostró señal positiva, robustez porque en las 14 cepas de *Salmonella* se obtuvo la señal esperada, en un total de cuatro repeticiones con iguales condiciones de trabajo en cuatro días no consecutivos. Asimismo, fue reproducible, pues los resultados fueron idénticos al modificar las condiciones de reacción. Al comparar la PCR con el cultivo convencional, usando preenriquecimiento no selectivo en agua peptonada y enriquecimiento selectivo en caldo selenito-cistina, se apreció que la PCR fue 100% sensible y específica, con 100% de inclusividad como de exclusividad.

Palabras Clave: *Salmonella* spp, reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), gen invA.

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of *Salmonella* spp. using the invA gene

A PCR protocol was developed to identify strains of *Salmonella* from different sources using a set of "primers" PCR specific to *Salmonella*, for the recognition of 119 bp invA gene sequence. The results met the maxims of selectivity: inclusiveness, all strains of *Salmonella* presented positive signal for the gene, exclusivity since no strain *Salmonella* (*Shigella*, *E. coli*, *E. coli* O157: H7) showed no signal positive robustness because in the 14 strains of *Salmonella* expected signal was obtained in a total of four repetitions with equal working conditions in four non-consecutive days. Also it was reproducible, results were identical by modifying the reaction conditions. Comparing PCR with conventional culture, using non-selective pre-enrichment in peptone water and selective enrichment in selenite-cystine broth, it was found that the PCR was 100% sensitive and specific, with 100% of inclusiveness, 100% exclusive and 100% of both positive and negative predictive value.

Key words: *Salmonella* spp - Polymerase Chain Reaction (PCR), gene invA.

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sensible de amplificación in vitro de segmentos de ADN que permite detectar genes específicos de grupos taxonómicos y genes implicados en la virulencia de bacterias patógenas, y así conducir a la identificación del microorganismo de interés (1). El éxito de la identificación depende de la existencia de una secuencia de ADN específica y exclusiva del organismo bajo estudio (2). Entre los microorganismos patógenos cuya detección requiere difundir el uso de PCR se encuentran los pertenecientes al género *Salmonella*, ya que a pesar de las variadas medidas de salud pública desarrolladas en el siglo pasado, *Salmonella* sigue siendo el causante de una toxiinfección alimentaria por zoonosis más importante a nivel mundial (3). La salmonelosis es una infección de importancia tanto en salud pública como salud animal debido al impacto económico que ocasiona. Se ha calculado que en Estados Unidos de América, la salmonelosis causa más de 18 mil hospitalizaciones y 500 defunciones anuales (4). A partir de diversas muestras de alimentos se ha realizado la detección e identificación rápida de *Salmonella*, mediante la PCR (5-6), empleando iniciadores que copian diversas secuencias blanco obteniendo productos para el reconocimiento de genes específicos de *Salmonella* entre los cuales se encuentra el gen invA (7 y 8). Este gen es

¹Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela.

²Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela.

³Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad de Carabobo. Venezuela.

⁴Centro de Investigaciones de Microbiología Ambiental (CIMA- UC). Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela.

Autor de correspondencia: Teresita Luigi.

E-mail: teresitaluigi@hotmail.com

Recibido: 1/8/2014

Aprobado: 6/11/2015

un factor de virulencia, relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal (8). En relación a los métodos convencionales de recuperación de *Salmonella* sp, los mismos requieren del aislamiento en medios selectivos, posterior identificación bioquímica y caracterización serológica, lo que se traduce en tiempo prolongado para su detección (de 5 a 7 días) (9). En contraste, mediante la PCR el tiempo de detección sería de aproximadamente 24 a 48 horas, dependiendo de las modificaciones en el protocolo de trabajo (10). Cabe resaltar que desde 1999 la Comisión Europea aprobó el proyecto de investigación, "FOOD-PCR", con la intención de aplicar y estandarizar el uso de PCR como diagnóstico para la detección de patógenos bacterianos en alimentos (1). No obstante, en Latinoamérica los avances han sido limitados a ciertos países de la región. Aunque a nivel mundial ya se ha empleado el gen *invA* para la identificación de *Salmonella*, en Venezuela no se conocen estudios o protocolos reportados sobre estandarización de la PCR empleando el gen *invA* específico, por lo que la adaptación del protocolo a las condiciones de nuestros laboratorios permitiría su implementación tanto la industria alimentaria como el sector clínico. Dada la importancia de *Salmonella* en la salud pública, sería beneficioso un protocolo de PCR rápido, específico y confiable. El objetivo del presente trabajo fue describir un protocolo de PCR para la detección de *Salmonella* spp, usando iniciadores PCR género específicos, los cuales generan un producto de 119 pb correspondiente al gen *invA*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas. El material de estudio estuvo constituido por 14 cepas diferentes de *Salmonella*, algunas provenientes de aislados clínicos del laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo (MFCS-UC), otras del Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología, Departamento de Estudios Clínicos, Escuela de Bioanálisis (PPB-EB-UC), sede Carabobo, de la misma universidad y cepas de referencia del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos, Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Las cepas que presentaron un perfil bioquímico compatible con *Salmonella* spp. fueron confirmadas mediante la prueba de aglutinación en placa con Antisuero Polivalente Somático O Difco™ (*Salmonella* O Antiserum Poly A-I & VI, 222641).

Cepas controles. Como control positivo se empleó un aislado de *Salmonella Enteritidis* perteneciente a la colección del CVCM. Como controles negativos se usaron 2 cepas de *Shigella boydii*, *Escherichia coli silvestre* y *Escherichia coli O157:H7* pertenecientes a la bacterioteca del MFCS-UC.

Método convencional para la detección de *Salmonella*. La detección de *Salmonella* fue realizada según la metodología descrita por COVENIN 1291 (11). La misma se desarrolló

siguiendo tres etapas: Un pre-enriquecimiento, en 225 mL de agua peptonada al 0,1 % donde se inoculó con cada una de las 14 cepas. Posteriormente se incubó a 37 °C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas del pre-enriquecimiento, se inició la etapa de enriquecimiento selectivo, para la cual se tomó 1 mL de la muestra pre-enriquecida y se inoculó por separado en tubos contentivos de 10 mL de Caldo Selenito-Cistina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), incubando los tubos a 37°C por 24 horas. Al culminar el período de incubación, se procedió al enriquecimiento diferencial. Las muestras provenientes de los caldos Selenito-Cistina se sembraron por agotamiento en placas de Petri con Agar MacConkey, Agar Xilosa- Lisina-Desoxicolato (XLD) y Agar *Salmonella*-Shigella (SS) (BBL™ Becton Dickinson and Company. Sparks, MD USA) respectivamente. De esta manera, se dispusieron de seis placas por cada muestra, las cuales fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron las colonias y posteriormente se seleccionaron 2 a 5 colonias para la caracterización fenotípica mediante el empleo del sistema automatizado API Lab Plus (Biomerieux).

Extracción de ADN Genómico. Las cepas bacterianas y la muestra de sangre total fueron sometidos a extracción de ADN genómico. Los inóculos experimentales de *Salmonella* fueron diluidos en el caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BBL™ Becton Dickinson and Company. Sparks, MD USA) hasta obtener recuentos desde 3 x 10 UFC/mL hasta 4 x 10⁹ UFC/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante los siguientes métodos:

a) Extracción mediante kit comercial. El procedimiento se realizó siguiendo las especificaciones del protocolo sugerido por la casa comercial (Wizard® Genomic ADN Purification Kit Promega. Madison, WI, EE.UU) para el aislamiento de ADN genómico a partir de bacilos Gram negativo. El ADN obtenido, se almacenó a 2-8 °C, hasta su análisis por PCR, de lo contrario fue conservado en un Biofreezer de -20°C (Cool- lab™ Lab-line Instruments, Inc.).

b) Extracción mediante choque térmico. Para adecuar este procedimiento a laboratorios con poca logística instrumental el choque térmico se efectuó en un termobloque a 95°C o en baño de agua hirviendo, ambos por 20 min. A tal fin 3 asadas de los cultivos bacterianos se resuspendieron en 100 µL de agua estéril y luego ambas muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos. Cada muestra fue almacenada a 4°C hasta su análisis por PCR.

Determinación de la concentración de ADN. Posterior a la extracción de ADN por los métodos antes descritos, se midió la absorbancia de una dilución de ADN 1:100 V/V (10 µL de solución de ADN en 990 µL de agua) a 260nm y a 280nm, y se procedió a calcular el cociente D.O.260nm /D.O.280nm. La concentración de ADN (µg/mL) fue calculado de acuerdo a Sambrook y Russell (12), empleando la siguiente formulación: [ADN]=50 (factor)* x100 (dilución) x D.O.260nm * (Factor =50 µg de ADN lee 1 unidad de Absorbancia a 260 nm/mL).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los ADN genómicos obtenidos fueron sometidos a la reacción en cadena de la polimerasa utilizándose iniciadores ("primers") PCR específicos para amplificar una secuencia de 119 pb del gen de invasión (*invA*) de *Salmonella* (acceso GenBank n° M90846) referido por Arnold et al (14). Los oligonucleótidos (iniciadores) empleados fueron: Styinva-JHO-2-left secuencia 5'-TCGTCATTCCATTACCTACC-3' y Styinva-JHO-2-right secuencia 5'-AAACGTTGAAAACTGAGGA-3'. La reacción de PCR, se llevó a cabo en microtubos Eppendorf de 1,5 mL en un volumen final de 50 μ L, conteniendo: 25 μ L de mezcla Master Mix 2X, 3 μ L de Primer *invA1* 100pM/ μ L, 3 μ L de Primer *invA2* 100pM/ μ L, 14 μ L de agua libre de nucleasa y 5 μ L del ADN. La reacción se realizó en un termociclador (MiniCyclerTM MJResearch) bajo las siguientes condiciones: un pre-ciclo a 94°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min c/u, 1 ciclo a 55°C por 1 min, 1 ciclo a 72°C por 1 min y una elongación final a 72°C por 10 min. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador de luz UV y la fotodocumentación se realizó empleando una cámara fotográfica Polaroid.

Controles del sistema PCR. Para evaluar la selectividad de la PCR se utilizaron diferentes controles cuyos ADN moldes se especifican a continuación: Control positivo: ADN genómico *Salmonella Enteritidis* (CVMC). Control de mezcla: mezcla sin muestra de ADN. Controles negativos y de especificidad de iniciadores: ADN genómico de *Escherichia coli silvestre*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella boydii*, ADN humano; mezcla de ADN de *Salmonella* más ADN de humano; mezcla con ADN de *Salmonella* más ADN de *Shigella spp.*, siguiendo recomendaciones internacionales por expertos en el área, la extracción del ADN, la preparación de las mezclas y los reactivos, el procesamiento de las muestras y la PCR, fueron realizadas en cabinas situadas en áreas separadas y alejadas de la zona donde se analizaron los productos amplificados.

Análisis Estadístico. Para el análisis estadístico de los resultados se compararon los resultados de la PCR con los obtenidos mediante el método de cultivo convencional, considerándose positivo a todo resultado en el que se observó señal de amplificación positiva para el gen *invA* y negativo a todo resultado en el cual no se observó señal positiva. Por otro lado, fueron calculados los índices de sensibilidad, especificidad, inclusividad y exclusividad para la PCR y la metodología convencional para la detección de *Salmonella spp*. Las mismas fueron calculadas de la siguiente manera: Sensibilidad(%)=[A/(C+A)]x100, Especificidad(%)=[B/(C+B)]x100, Inclusividad(%)=[A/A+B]x100, Exclusividad(%)=[D/C+D]x100. Donde B, correspondió al número de verdaderos negativos; A, al número de verdaderos positivos; D, al número de falsos negativos, y C, al número de falsos positivos (13).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos luego de la extracción de ADN genómico a partir de *Salmonella spp*, se reportan en la

tabla 1. En relación a la extracción realizada mediante kit comercial (Wizard, Promega), la misma presentó un cociente D.O.260nm /D.O.280nm de 1,79 con una desviación estándar (DE) de $\pm 0,13$ y un coeficiente de variación (CV) de 7,3 %. De igual manera, los ADN genómicos obtenidos, empleando los métodos de extracción físicos, presentaron cocientes D.O.260nm /D.O.280nm de 1,28 (DE $\pm 0,23$ y CV=17,5%) para la extracción en baño en agua hirviente, y de 1,51 (DE $\pm 0,09$ y CV= 6,1 %) con el calentamiento en termobloque.

Tabla 1. Cociente D.O.260nm /D.O.280nm y concentración de ADN de *Salmonella spp*. obtenido por los métodos de extracción evaluados.

	Cociente	DE*	CV*	Concentración
	D.O. _{260nm} /D.O. _{280nm}		(%)	(μ g/mL)
Kit Comercial	1,79	$\pm 0,13$	7,3	1000
Termobloque	1,51	$\pm 0,09$	6,1	745
Ebullición en baño	1,28	$\pm 0,23$	17,5	535

*DE: Desviación Estándar *CV: Coeficiente de Variación

Respecto a la concentración de ADN obtenida con el empleo de los diferentes métodos, y partiendo de una suspensión de bacteriana con igual recuento de microorganismos (4 x 10⁹ UFC/mL), se obtuvo mediante el kit comercial una media de 1000 μ g de ADN, con el calentamiento en termobloque se obtuvieron 745 μ g de ADN y mediante ebullición en baño de agua 535 μ g de ADN. Los resultados evidencian una mayor concentración de ADN extraído por el kit comercial en relación a los métodos físicos. No obstante, todos los fragmentos de ADN genómicos extraídos independientemente del método usado, lograron ser amplificados por la PCR.

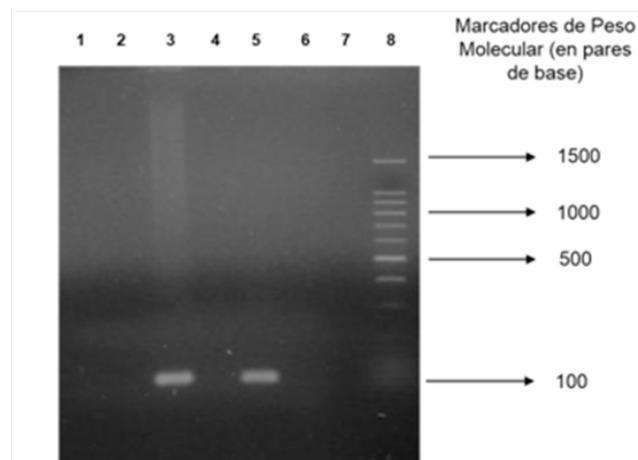


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación del gen *invA* por PCR. Carril 1: ADN *Escherichia coli* O157:H7; Carril 2: ADN *Shigella boydii* Carril 3: ADN *Salmonella* (CVCM); Carril 4: ADN de sangre total humana Carril 5: ADN *Salmonella* (aislado 3); Carril 6: Mezcla sin muestra de ADN; Carril 7: ADN *Escherichia coli* salvaje; Carril 8: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Todas las muestras de ADN fueron extraídas por el kit comercial.

En la figura 1 se observan los productos de amplificación (amplicones) provenientes de la reacción de PCR utilizando ADN de *Salmonella* (CVCM y un aislado clínico), *E. coli* (cepas O157H7 y cepa silvestre) y de *Shigella*. Además se incluyó una reacción con ADN de sangre total humana y un sistema sin ADN.

Los amplicones producidos, con una masa molecular de 119 pb, sólo se detectaron en los sistemas suplementados con ADN de *Salmonella* (carriles 3 y 5), no detectándose en los sistemas de *E. coli*, *Shigella*, ADN humano y sin ADN.

En la figura 2 se observa el amplicón de 119 pb en las reacciones de amplificación correspondientes a diferentes cepas de *Salmonella* (*S. choleraesuis*, *S. Enteritidis* CVCM, *S. paratyphi B* y *S. typhimurium*; carriles 1, 2, 4 y 5, respectivamente); de nuevo en las reacciones con ADN de *E. coli* y *Shigella* no se detectó producto de amplificación.

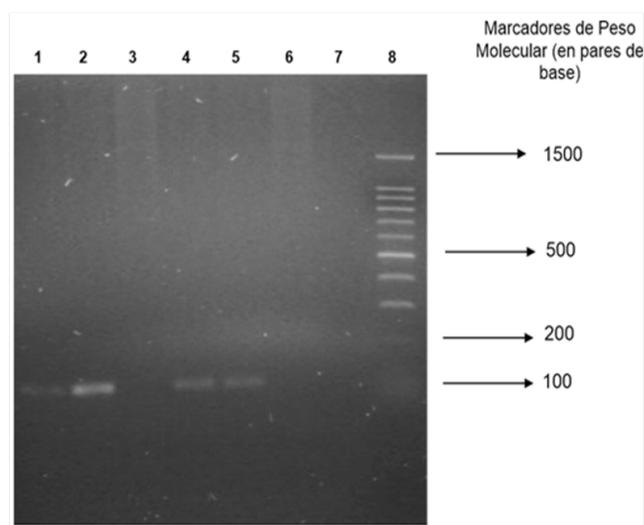


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación del gen *invA* por PCR. Carril 1: ADN *Salmonella choleraesuis*; Carril 2: ADN *Salmonella* (CVCM); Carril 3: ADN *Escherichia coli* O157:H7 (Control negativo); Carril 4: ADN *Salmonella paratyphi B*; Carril 5: ADN *Salmonella typhimurium*; Carril 6: ADN *Shigella boydii* (Control de especificidad); Carril 7: ADN *Escherichia coli* salvaje; Carril 8: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Promega. Madison, WI, EE.UU.) Todas las muestras de ADN fueron extraídas por el kit comercial.

En la figura 3 se muestran los amplicones obtenidos al procesar diferentes cantidades de las cepas bacterianas (y por ende de ADN), el intervalo de concentraciones fue de 10⁹ UFC/mL (*S. typhimurium*, carril 1) a 3x10⁷ UFC/mL (*S. Enteritidis*, carril 7). En todos los casos se detectó el amplicón de 119pb, evidenciándose un límite de detección que debería ser inferior a 3x10⁷ UFC/mL (*S. Enteritidis*, carril 7). Cualitativamente se observa que a mayor número de células procesadas, se obtuvo una mayor intensidad del amplicón detectado.

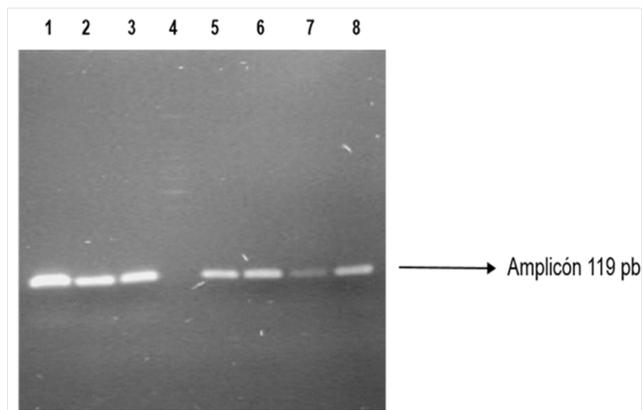


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación por PCR usando iniciadores correspondientes al gen *invA* de *Salmonella typhimurium*. Carril 1: *Salmonella typhimurium* (109 UFC/mL) Carril 2: *Salmonella Enteritidis* (105 UFC/mL); Carril 3: *Salmonella choleraesuis* (106 UFC/mL); Carril 4: Sin muestra de ADN; Carril 5: *Salmonella paratyphi B* (104 UFC/mL); Carril 6: *Salmonella Enteritidis* (5 x 10² UFC/mL); Carril 7: *Salmonella Enteritidis* (3x10⁷ UFC/mL) Carril 8: *Salmonella spp.* (102 UFC/mL). Todas las muestras de ADN fueron extraídas por el kit comercial.

Tabla 2. Amplificación por PCR del gen *invA* de diferentes cepas de *Salmonella spp.*, otras enterobacterias y ADN humano.

MICROORGANISMO	SEÑAL PCR
<i>Salmonella</i> Enteritidis (Aislado 1)	POSITIVA
<i>Salmonella</i> Enteritidis (Aislado 2)	POSITIVA
<i>Salmonella</i> Enteritidis (Aislado 3)	POSITIVA
<i>Salmonella</i> Enteritidis (Aislado 4)	POSITIVA
<i>Salmonella choleraesuis</i> (Aislado 1)	POSITIVA
<i>Salmonella choleraesuis</i> (Aislado 2)	POSITIVA
<i>Salmonella choleraesuis</i> (Aislado 3)	POSITIVA
<i>Salmonella paratyphi B</i>	POSITIVA
<i>Salmonella typhimurium</i>	POSITIVA
<i>Salmonella spp</i> (Aislado 1)	POSITIVA
<i>Salmonella spp</i> (Aislado 2)	POSITIVA
<i>Salmonella spp</i> (Aislado 3)	POSITIVA
<i>Salmonella spp</i> (Aislado 4)	POSITIVA
<i>Salmonella spp</i> (Aislado 5)	POSITIVA
<i>Shigella boydii</i> (Aislado 1)	NEGATIVA
<i>Shigella boydii</i> (Aislado 1)	NEGATIVA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NEGATIVA
<i>Escherichia coli</i> Silvestre	NEGATIVA
ADN humano	NEGATIVA

Resumiendo, en la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos en la PCR al usar como fuente de ADN diversas cepas de *Salmonella* y otros microorganismos enteropatógenos de diferente procedencia. Todas las cepas de *Salmonella* fueron positivas para la amplificación del gen *invA*, mientras que fue negativa las cepas de *E. coli*,

Shigella y ADN humano. Al analizar la robustez de la técnica, como parámetro al evaluar un método cualitativo se debe mencionar que las catorce distintas cepas de *Salmonella* sometidas a ensayo presentaron la señal esperada en un total de cuatro repeticiones empleando las mismas condiciones de trabajo (ensayo intralaboratorio) en cuatro días diferentes no consecutivos. El análisis estadístico de los datos obtenidos (tabla 3) indicaron los siguientes resultados: 100% de sensibilidad y especificidad, 100% de inclusividad, 100% de exclusividad, 100% de valor predictivo positivo y 100% de valor predictivo negativo. Por lo tanto, al comparar la PCR con el método de cultivo convencional, se pudo apreciar que la técnica de PCR empleando el gen *invA* para la identificación de *Salmonella* desarrollada en esta investigación, cumple con los parámetros idóneos para la óptima evaluación de un ensayo de laboratorio.

Tabla 3. Parámetros de Sensibilidad, especificidad, inclusividad y exclusividad obtenidos al comparar el método convencional de detección de *Salmonella* con la PCR (gen *invA* *Salmonella*).

	Método Convencional (COVENIN 1291-2004)	PCR
Verdaderos Positivos (A)	14	14
Verdaderos Negativos (B)	4	4
Falsos Positivos (C)	0	0
Falsos Negativos (D)	0	0
% SENSIBILIDAD	100%	100%
% ESPECIFICIDAD	100%	100%
% INCLUSIVIDAD	100%	100%
% EXCLUSIVIDAD	100%	100%

DISCUSIÓN

Entre los métodos de extracción de ADN evaluados en la presente investigación, el kit comercial permitió la obtención de una mayor concentración de ADN genómico. Sin embargo, aunque los métodos físicos de extracción arrojaron concentraciones de ADN inferiores a las obtenidas por el kit comercial, todos los fragmentos de ADN genómico extraídos lograron ser amplificados por la PCR, generándose el amplicón esperado. La diferencia en la cantidad de ADN extraídos con los diferentes protocolos es debido a que con el kit comercial se efectúa una desproteización del ADN, mientras que en los protocolos con choque térmico no se efectúa. Aunque los cocientes D.O.260nm /D.O.280nm fueron menores en los métodos físicos y por lo tanto, la pureza del ADN extraído (evidenciado por los cocientes D.O.260nm /D.O.280nm) fue menor, ello no influyó en la amplificación correcta del gen *invA*. En términos de tiempo de ejecución, el método de extracción con calor por calentamiento en agua hirviendo puede ser considerado como un método adecuado para ser implementado previo a la PCR, ya que resulta menos engorroso. En cuanto al

procedimiento, no involucra digestión con proteinasa K, extracción con fenol/cloroformo ni los riesgos inherentes a la misma, ni de equipo calentador. Además de sencillo, económico y no dependiente de reactivos o kits importados, permite reducir el tiempo de extracción, permitiendo el procesamiento simultáneo de gran número de muestras (14), las cuales constituyen bondades que pudiesen influir en adoptar esta sencilla técnica en los laboratorios de rutina microbiológica en el país. Cabe señalar que los resultados indican que aún con bajas concentraciones de ADN, bajo estas condiciones experimentales, es posible obtener un proceso de amplificación apropiado. Por otro lado, la PCR es una técnica sensible cuyo éxito en su implementación depende, entre otros factores, de la elección correcta de la secuencia blanco, la cual debe permitir la identificación del microorganismo de interés, independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN procedente de microorganismos concomitantes o de la muestra misma (15). La alta especificidad de la PCR empleando el gen *invA* para detectar *Salmonella* confirmó que la secuencia de 119 pb de dicho gen contiene secuencias únicas para el género, por lo que es un blanco conveniente de PCR. Es importante comentar que métodos basados en la PCR usando el gen *invA* han dado como resultado la detección positiva de *Salmonella*. Esto es importante para que instituciones como la FDA promuevan la implementación de la técnica de forma rutinaria (16). En relación a la presente investigación, a diferencia de otros trabajos el protocolo, fue totalmente modificado, observándose resultados positivos para la detección de *Salmonella*, inclusive cuando se varió intencionalmente algunos pasos del procedimiento, en especial los relacionados a volúmenes de mezcla (se ensayó la PCR con volúmenes finales de 50, 25 y 20 μ L), obteniéndose el amplicón esperado con el empleo de hasta 20 μ L de mezcla de reacción y 2 μ L de muestra de ADN. Es importante destacar que la PCR debe cumplir parámetros de confiabilidad respaldados por un adecuado empleo de controles en el sistema de PCR (7). Para obtener un resultado confiable a partir de una técnica de diagnóstico basada en PCR se sugiere utilizar un control positivo, un control negativo y un control "blanco" de reactivos. Además, la inclusión de un control interno de amplificación (IAC, según siglas en inglés) puede evidenciar una falla en cada tubo de reacción, ya sea por la presencia de inhibidores o por un problema particular inherente a la técnica, situación que ha sido descrita al analizar muestras de alimentos. En esta investigación se incluyeron controles positivos y un blanco. Sin embargo, no se consideró la incorporación de un IAC porque la misma fue diseñada en una primera fase de experimentación para ser utilizada como tamizaje o confirmación a partir de cultivos o suspensiones bacterianas y no directamente de muestra de alimentos, donde generalmente se pueden encontrar los inhibidores de la PCR, en especial, de la taq polimerasa. La técnica ensayada presentó buen desempeño al utilizar el ADN correspondiente 3×10 UFC/mL de *S. Enteritidis*. No se observaron interferencias al utilizar concentraciones elevadas de ADN (hasta 109 UFC/mL), ni al combinar distintas concentraciones de cepas bacterianas, lo cual

evidencia la alta especificidad de la técnica. Se demostró que la técnica de PCR fue reproducible observándose iguales resultados inclusive cuando se varió la cantidad de ADN, obteniéndose el amplicón esperado con el empleo de hasta 20 µL de mezcla de reacción y 2 µL de muestra.

En conclusión, la PCR para el gen *invA* de *Salmonella* resultó ser altamente específica y sensible para la detección de miembros de este género en suspensiones bacterianas con recuentos desde 4 x 10⁹ UFC/mL hasta 3 x 10¹⁰ UFC/mL. Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales establecidas cumplieron con los requisitos de selectividad, exclusividad, robustez y reproducibilidad, lo cual tiende a validar y estandarizar el uso de la PCR en la determinación de *Salmonella spp.* Asimismo, a diferencia del método convencional de detección de *Salmonella*, el cual resulta laborioso y requiere de medios de cultivos para su reactivación, aislamiento en medio selectivo y caracterización fenotípica mediante el empleo del sistema automatizado API Lab Plus (Biomeriux), (siendo necesario de 5 a 7 días para confirmar los resultados), con la PCR usando el gen *invA*, el tiempo de detección por PCR fue de 24h, lo cual se traduce en un balance positivo en la economía de las empresas, así como de las instituciones del estado encargados de velar por la salud pública al lograr un diagnóstico rápido y preciso. Se sugiere continuar desarrollando investigaciones donde se aplique este protocolo de PCR para detectar *Salmonella* a partir de alimentos.

Agradecimiento. Los autores desean expresar su agradecimiento al personal del Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA) de la Universidad de Carabobo, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Mandal P, Biswas A, Choi K, Pal U. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am J Food Technol.* 2011; 6(2): 87-102.
- González J., Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. Microbiological Isolation of *Salmonella spp.* And Molecular tools for detection. *Revista Salud Uninorte.* 2014; 30(1): 73-94.
- Arcos E, Mora L, Fandino L, Rondón I. Prevalencia de *Salmonella spp.* en carne porcina, plantas de beneficio y expendios del Tolima. *Orinoquia.* 2013; 17 (1): 59-68.
- Gutiérrez A, Paasch L, Calderón N. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet Méx.* 2008; 39(1): 81-90.
- Koyuncu S, Andersson M, Häggblom P. Accuracy and sensitivity of commercial PCR-based methods for detection of *Salmonella enterica* in feed. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(9): 2815-2822.
- Acosta L, Pinedo J, Hernández E, Villarreal J. Comparación de los métodos de inmunoensayo enzimático automatizado (VIDAS) y PCR para la detección de *Salmonella spp.* en expendios de la ciudad de Santa Marta (Colombia). 2013. *Salud Uninorte.* 2013; 29(2) :174-182
- Shanmugasam, M, Velayutham T, Rajeswar J. Inv A gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. *Veterinary World.* 2011; 4(12): 562-564.
- Chacón L, García C, Barrantes K, Achí R. Estandarización de un método de PCR para la detección de *Salmonella spp.* en lechuga. *Rev Soc Ven. Microbiol.* 2010; 30:18-23.
- Villareal J, Soto Z, Pereira N, Varela L, Jaramillo R., Villanueva D, Mendoza E. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Salmonella sp.* en leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte.* 2011. 24(2): 216-225
- Palomino C, González Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014; 31(3).
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma N°: 1291. Alimentos. Aislamiento e identificación de *Salmonella*. 1988 (Ira. rev.).
- Sambrook, J y Russell, D. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* (3 a ed). CSH Laboratory Press, cold Spring Harbor. NY. 2001.
- Leotta G, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed I, Motter M., Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argent Microbiol.* 2005; 37: 1-10.
- Osorio E, Ramírez M, López A, Mambuscay L. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev colomb Biotecnol;* 2009; (1): 125-131.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velásquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. 2013; 2 (2): 70-78.
- González N, Hammack T, Russell M, Jacobson A, De Jesús A, Brown E, Lampel, K. Detection of live *Salmonella sp.* cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting *invA* mRNA. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(11): 3714-3720.