

## Serotipificación y detección genética de *Salmonella* spp de origen aviar

### Serotyping and genetic detection of *Salmonella* spp of avian origin

Freshia Huarcaya R.<sup>1,2</sup>, Sonia Calle E.<sup>1,3</sup>, Juan Siuce M.<sup>1</sup>, André Sedano S.<sup>1</sup>, Jhonatan Huamaní P.<sup>1</sup>, Arturo García B.<sup>1</sup>, Luis Álvarez V.<sup>1</sup>, Sofía Gonzales M.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar molecular y serológicamente *Salmonella* spp presentes en aislados de huevos, canales y vísceras aviares. Se evaluaron 46 aislados de origen aviar identificados como *Salmonella* spp mediante cultivos y pruebas bioquímicas en el periodo 2012-2017, procedentes de varios distritos de la ciudad de Lima. Estos aislados son conservados en el cepario de Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se reactivaron las cepas, y se reconfirmaron las colonias sospechosas a *Salmonella* spp mediante el cultivo en medios selectivos. Posteriormente se realizó el PCR a las muestras sospechosas como método de diagnóstico genético de *Salmonella*. Se detectó el gen de invasividad *invA*, gen involucrado con la virulencia de *Salmonella*. Se realizó la serotipificación con antiseros polivalentes y monovalentes para serogrupo y serovar en el Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS), y finalmente se determinaron las serovariedades de acuerdo con el esquema propuesto por Kauffmann-White. Las 46 cepas evidenciaron bandas de peso molecular correspondientes al gen *invA* (244 pb).

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> E-mail: [freshiahuarcaya@gmail.com](mailto:freshiahuarcaya@gmail.com)

<sup>3</sup> E-mail: [scallee@unmsm.edu.pe](mailto:scallee@unmsm.edu.pe)

Recibido: 15 de diciembre de 2020

Aceptado para publicación: 30 de marzo de 2022

Publicado: 29 de junio de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

Todas las cepas fueron identificadas mediante serotipificación, obteniendo: *S. Infantis* (34.8%), *S. Pullorum* (34.8%), *S. Gallinarum* (15.2%), *S. Enteritidis* (8.7%) y *S. Typhimurium* (6.5%). Los resultados revelan la predominancia de los serovares circulantes en muestras aviares, así como su implicancia en la salud pública.

**Palabras clave:** *Salmonella*, serovar, gen *invA*, PCR, serotipificación

## ABSTRACT

The aim of this study was to molecularly and serologically identify *Salmonella* spp present in isolates from avian eggs, carcasses, and viscera. In total, 46 isolates of avian origin identified as *Salmonella* spp were evaluated through cultures and biochemical tests in the period 2012-2017 from various districts of Lima. These isolates are kept in the Bacteriology Laboratory stock of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. The strains were reactivated, and suspicious *Salmonella* spp colonies were reconfirmed by culturing on selective media. Subsequently, the PCR was performed on the suspicious samples as a method of genetic diagnosis of *Salmonella*. The invasiveness gene *invA*, a gene involved with the virulence of *Salmonella*, was detected. Serotyping was performed with polyvalent and monovalent antisera for serogroup and serovar in the Enteropathogens Laboratory of the National Institute of Health (INS), and finally the serovars were determined according to the scheme proposed by Kauffmann-White. The 46 strains showed molecular weight bands corresponding to the *invA* gene (244 bp). All strains were identified by serotyping, obtaining *S. Infantis* (34.8%), *S. Pullorum* (34.8%), *S. Gallinarum* (15.2%), *S. Enteritidis* (8.7%) and *S. Typhimurium* (6.5%). The results reveal the predominance of circulating serovars in avian samples, as well as their implication in public health.

**Key words:** *Salmonella*, serovar, *invA* gene, PCR, serotyping

## INTRODUCCIÓN

La salmonelosis constituye una de las ETA (Enfermedades transmitidas por alimentos) más comunes en el mundo, la cual afecta tanto a los animales como a seres humanos. Se reconoce que las aves de corral y el ganado vacuno y porcino constituyen sus principales reservorios, así como los productos cárnicos que derivan de ellos, los cuales en conjunto representan un riesgo para la salud pública (Gutiérrez *et al.*, 2008).

La salmonelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Salmonella*, la cual comúnmente está asociada a cuadros diarreicos en humanos. Los principales agen-

tes se encuentran dentro de las especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; las cuales, a su vez se subdividen en más de 2500 serovariedades, donde predominan los serovares de la subespecie *enterica* en los aislados de muestras clínicas (Grimont y Weill, 2007; Caffer *et al.*, 2008). Las serovariedades no tíficas de *Salmonella* spp cuentan con una amplia distribución a nivel mundial y representan un importante riesgo zoonótico (Doyle y Buchanan, 2013).

El papel de *Salmonella* en la cadena alimentaria mundial, sus repercusiones actuales y proyectadas frente a la salud pública son motivo de preocupación sanitaria. Es por ello que el empleo de métodos sensibles, específicos, rápidos y replicables para la detec-

ción de dichos agentes en muestras clínicas y en alimentos es fundamental para su identificación, monitoreo, prevención y control. Dentro de dichos métodos, las técnicas moleculares como el PCR representan una herramienta diagnóstica de alta sensibilidad para la detección de patógenos (Abd El Tawwab *et al.*, 2013).

Durante el proceso de adaptación, la *Salmonella* ha generado una variedad de mecanismos para colonizar, invadir, replicar y sobrevivir dentro del huésped, debido en parte al desarrollo de un sistema de secreción de proteínas asociadas con la invasión bacteriana, el cual depende de un componente esencial codificado por el gen *invA*, presente en todas las cepas virulentas de *Salmonella*. Es por ello que se estableció la presencia del gen *invA* como una diana genética de *Salmonella* en métodos de PCR (Espinal *et al.*, 2006; Martínez, 2007).

La serotipificación es parte de la caracterización epidemiológica de los aislados, ya que faculta la determinación de la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, y es pieza importante en los estudios de brotes al poder determinar la fuente de infección y vías de transmisión (Herikstad *et al.*, 2002). La serotipificación permite determinar la composición antigénica del organismo, para luego agruparlos en serovariedades, mediante el empleo del esquema de Kauffmann-White (Caffer *et al.*, 2008). El objetivo del presente trabajo fue, por lo tanto, la caracterización de 46 aislados compatibles bioquímicamente con *Salmonella* spp (mediante bioquímicas convencionales) Para ello se realizó la caracterización genética determinando la presencia del gen *invA*, así como la caracterización serológica, objetivo de mayor significancia por su importancia epidemiológica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Se analizaron 46 aislados de *Salmonella* spp de origen aviar, los cuales fueron aislados y almacenados en el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, entre los años 2012 y 2017. El cepario constituye un registro de todas las muestras positivas por evaluación fenotípica y bioquímica a *Salmonella* spp, sin discriminar por patogenicidad. Las cepas se encuentran preservadas en caldo cerebro corazón (BHI) con glicerol al 20% en tubos de 2 ml a una temperatura de -20 °C. Este registro está conformado por muestras provenientes de huevos comerciales (21/46), foliculos ováricos (6/46), carcasa de pollos de engorde (3/46), y de vísceras como bazo (9/46) e hígado (7/46). El servicio de bacteriología de alimentos es parte del servicio de diagnóstico que ofrece el laboratorio, de allí la recepción de muestras de esta naturaleza.

Como cepa de referencia positiva se empleó a la *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y como cepa de control negativo a *Escherichia coli* ATCC 8739.

### Reactivación de Cepas

Los 46 aislados de *Salmonella* spp y las dos cepas de referencia fueron reactivados empleando un protocolo modificado de Sánchez y Corrales (2005). Los viales fueron descongelados para proceder con la recuperación de los microorganismos. Se inoculó 10 µl de las cepas en el medio TSB (tripticasa de soya) y mantenidos a 37 °C durante 18 horas. Luego fueron sembrados por agotamiento en medios selectivos: Agar MacConkey (MC) y en Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) e incubados a 37 °C durante 24 horas.

Cuadro 1. Cebadores usados en el PCR

Genes	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Tamaño de producto (pb)
<i>invA</i>	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	244

Fuente: Bhatta *et al.* (2007)

La siembra en agar MacConkey permite detectar con rapidez bacterias gram negativas no fermentadoras de lactosa como *Salmonella* spp (las colonias sospechosas son incoloras). La siembra en agar XLD se hizo para poder observar el crecimiento característico de *Salmonella*: colonias circulares transparentes con tonos rojizos y centro negro debido a la liberación de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S).

Las colonias de *Salmonella* se inocularon finalmente en tubos de microcentrífuga de 2 ml conteniendo 1500 µl de TSB e incubados a 37 °C durante 3 h.

### Análisis de Muestras

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit comercial Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification (ThermoFisher Scientific), siguiendo las especificaciones recomendadas por el fabricante. El material genético extraído se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y almacenados a -20 °C.

Para la caracterización genética se realizó el PCR con el ADN extraído. Se emplearon cebadores de 244 pb que codifican secuencias específicas del gen *invA* (Bhatta *et al.*, 2007) (Cuadro 1). El volumen final de muestra fue ajustado a 20 µl, el cual contenía 10 µl de mezcla HotStarTaq® Master Mix 2X (Qiagen Group, Alemania), 1 µl de cebador

*invA*1, 1 µl de cebador *invA*2, 6 µl de agua libre de nucleasas (H<sub>2</sub>O up) y 2 µl del ADN previamente extraído. Para la reacción de amplificación se empleó un termociclador Biometra TOne (Analytik Jena, Alemania) bajo las siguientes condiciones: incubación inicial a 94 °C durante 1 min, 30 ciclos con una desnaturalización de 30 s a 94 °C, hibridación de 30 s a 60 °C, extensión de 2 min a 72 °C y una extensión final durante 10 min a 72 °C.

Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% más buffer TBE 0.5X durante 75 min a 100V. Los productos fueron analizados en el transiluminador SafeView de luz azul. Para la determinación del tamaño se emplearon marcadores de peso molecular de 100pb Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials). Como reactivo fluorescente para la visualización instantánea de las bandas de ADN se usó el colorante Safe-Green TM (Applied Biological Materials).

Posteriormente se procedió a establecer las serovariedades mediante el empleo de kits serológicos comerciales compuestos de antisueros somáticos y flagelares (Denka Seiken, Japón), siguiendo las recomendaciones indicadas por Caffer *et al.* (2008). La serotipificación se llevó a cabo en el Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS) del Perú.

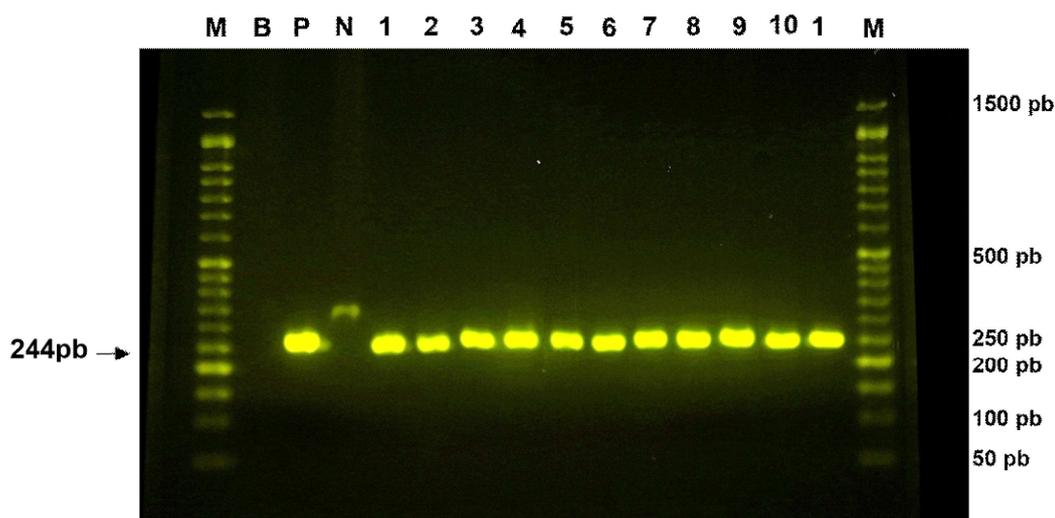


Figura 1. PCR para la detección del gen *invA*. Carriles: M: marcador de peso molecular de 100pb, B: Control blanco, P: Control positivo cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, N: Control negativo cepa *E. coli* ATCC 8739, 1-11: Cepas en estudio presentan bandas de 244 pb

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis molecular de los aislados de *Salmonella* spp permitió identificar una secuencia del gen *invA* en las 46 muestras procesadas (Figura 1). Este hallazgo fue consistente a lo descrito por múltiples estudios en muestras de alimentos de procedencia animal (Das *et al.*, 2012) incluyendo los de origen aviar (Borges *et al.*, 2013; Fardsanei *et al.*, 2017) y de muestras clínicas colectadas de animales y humanos (De Oliveira *et al.*, 2003; Luigi *et al.*, 2015). De manera similar, diversos autores (Rahn *et al.*, 1992; Malorny *et al.*, 2003; Espinal *et al.*, 2006; Turki *et al.*, 2014) reportaron frecuencias relativamente altas del gen *invA* en aislados de *Salmonella* spp (97.3-99.6%). Esta ligera diferencia en las frecuencias en referencia al presente estudio pudo deberse a una pérdida o delección de la isla de patogenicidad SPI1, lo cual podría afectar la detección del gen debido a una

alteración en el sitio de inserción en el cromosoma y/o remoción de los genes contenidos en la isla, probablemente por la transferencia horizontal de dichos bloques de genes de virulencia (Espinal *et al.*, 2006).

Es probable que la alta tasa (100%) de detección reportada en el presente estudio sea debido a que el gen *invA* representa a un gen de invasión altamente conservado entre los serotipos patógenos de *Salmonella enterica* (De Oliveira *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2012).

A nivel serológico, en el presente estudio se identificaron los serotipos Infantis (16/46, 34.8%), Pullorum (16/46, 34.8%), Gallinarum (7/46, 15.2%), Enteritidis (4/46, 8.7%), y Typhimurium (3/46, 6.5%). De los cuales tres de ellos representan un riesgo en salud pública (23/46, 50%) (*S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*), debido a que son agentes con potencial zoonótico causales

de salmonelosis no tifoidea en el hombre. Los serotipos restantes (23/46, 50%) *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* son microorganismos responsables de ocasionar la pullorosis y tifosis aviar, respectivamente, en diversas especies de aves domésticas (Terzolo, 2009).

*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son los serovares predominantes en infecciones por *Salmonella* no tifoidea en humanos; sin embargo, en los últimos años *S. Infantis* se ha convertido en un serotipo emergente entre los causantes de salmonelosis no tifoidea, hallazgo que podría estar asociado a la elevada frecuencia de este serovar en aves de corral. Además, su resistencia a múltiples fármacos parece ser propagada exitosamente entre productos de origen aviar y humanos a través de la cadena alimentaria (EFSA-ECDC, 2015, 2018; Pate *et al.*, 2019). Se ha demostrado que las cepas emergentes de *S. Infantis* se caracterizan por mutaciones cromosómicas adaptativas y un megaplásmido que le confiere resistencia a múltiples antimicrobianos, metales pesados y desinfectantes. Debido a esto tiene una ventaja significativa, tanto en el medio ambiente como en el hospedero, haciendo que su difusión sea más eficiente y rápida (Aviv *et al.*, 2014).

En Perú, se han reportado datos que demuestran que *S. Infantis* es el serotipo más frecuente en granjas avícolas (91.4%) (Valderrama *et al.*, 2014), mientras que en 2011 se demostró que era el tercer serotipo más frecuente en aislados de muestras clínicas de humanos y de alimentos (Zamudio *et al.*, 2011). Esto podría estar relacionado con los datos actuales que indican que el 65% (193/297) de muestras clínicas de humanos remitidas de diversas regiones del Perú hayan sido confirmadas como *Salmonella Infantis* (Quino *et al.*, 2019). Estos hallazgos sugieren que es el serovar predominante desde el punto de vista epidemiológico en el país.

El presente trabajo no es un estudio probabilístico y se tuvo, además, la limitante del pequeño número de muestras evaluadas,

y que no representan de ese modo a la región Lima. No obstante, el hallazgo de 50% de muestras positivas a serotipos de *Salmonella* con carácter zoonótico sigue siendo una advertencia.

## CONCLUSIONES

- Los serotipos hallados en el presente estudio fueron *S. Infantis*, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aislados de *Salmonella* de origen aviar del cepario de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Todos los aislados (n=46) identificados como *Salmonella* spp mediante bioquímica convencional codificaron el gen *invA*.

## LITERATURA CITADA

1. **Abd El, Tawwab AA, Ammar AM, Ali AR, El Hofy FI, Sayed MEE. 2013.** Detection of common (*invA*) gene in *Salmonellae* isolated from poultry using polymerase chain reaction technique. *BVMJ* 25: 70-77.
2. **Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon-Divon M, Cornelius A, Rahav G, Grassl GA, et al. 2014.** A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar *Infantis* strain. *Environ Microbiol* 16: 977-994. doi: 10.1111/1462-2920.12351
3. **Bhatta DR, Bangtrakulnonth A, Tishyadhigama P, Saroj SD, Bandekar JR, Hendriksen RS, Kapadnis BP. 2007.** Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. *Lett Appl Microbiol* 44: 588-594. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02133.x

4. **Borges KA, Furian TQ, Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. 2013.** Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from chicken in South of Brazil. *Pesqui Vet Brasil* 33: 1416-1422. doi: 10.1590/S0100736X2013-001200004
5. **Caffer MI, Terragno R, Binsztein N. 2008.** Manual de procedimientos: diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 36 p.
6. **Das A, Sree S, Shalini U, Ganeshkumar A, Karthikeyan M. 2012.** Molecular screening of virulence genes from *Salmonella enterica* isolated from commercial food stuffs *Biosci Biotechnol Res Asia* 9: 363-369. doi: 10.13005/bbra/1009
7. **De Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MIR, Wageck C, Brandelli A. 2003.** Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different source. *Braz J Microbiol* 34: 123-124. doi: 10.1590/S1517-83822003000500042
8. **Doyle MP, Buchanan RL. 2013.** Food microbiology: fundamentals and frontiers. 4<sup>th</sup> ed. Washington: ASM Press. 1118 p.
9. **[EFSA], [ECDC] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2015.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13: 190 p. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329
10. **[EFSA], [ECDC] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2018.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12): 262 p. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500
11. **Espinal P, Prieto E, Otero V, Máttar S. 2006.** Presencia del gen de invasión invA en cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Rev Cub Salud Pública* 32: 115-120.
12. **Fardsanei F, Soltan MM, Douraghi M, Zahraei T, Mahmoodi M, Memmariansi H, Nikkhahi F. 2017.** Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microb Pathogenesis* 107: 451-456. doi: 10.1016/j.micpath.-2017.04.026
13. **Grimont PA, Weill FX. 2007.** Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 9<sup>th</sup> ed. France: WHO. 166 p.
14. **Gutiérrez AC, Paasch L, Calderón NL. 2008.** Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet México* 39: 81-90.
15. **Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. 2002.** Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect* 129: 1-8. doi: 10.1017/S0950268802006842
16. **Luigi T, Rojas L, Valbuena O. 2015.** Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp usando el gen invA. *Salus* 19: 41-46.
17. **Malorny B, Hoofar J, Bunge C, Helmuth R. 2003.** Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microb* 69: 290-296. doi: 10.1128/AEM.69.1.290-296.2003
18. **Martínez N. 2007.** Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis Doctoral. Oviedo: Univ. de Oviedo. 156 p.
19. **Pate M, Micunovic J, Golob M, Vestby LK, Ocepek M. 2019.** *Salmonella* Infantis in broiler flocks in Slovenia: the prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability. *Biomed Res Int* 2019: 1-13. doi: 10.1155/2019/4981463

20. **Quino W, Hurtado CV, Escalante O, Flores D, Mestanza O, Vences F, Zamudio ML, et al. 2019.** Multidrogorresistencia de *Salmonella* Infantis en Perú: un estudio mediante secuenciamiento de nueva generación. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 36: 37-45. doi: 10.17843/rpmesp.2019.361.3934
21. **Rahn k, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, et al. 1992.** Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 6: 271-279. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-f
22. **Sánchez LC, Corrales LC. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova* 3: 21-29. doi: 10.22490/24629448.333
23. **Terzolo HR. 2009.** Tifosis y paratifosis de las aves en Latinoamérica y en el mundo. En: XXI Congreso Latinoamericano de Avicultura. La Habana: Asociación Latinoamericana de Avicultura.
24. **Turki Y, Mehri I, Ouzari H, Khessairi A, Hassen A. 2014.** Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella enterica* serotypes. *J Gen Appl Microbiol* 60: 123-130. doi: 10.2323/jgam.60.123
25. **Valderrama M, Quevedo M, Pastor J, Mantilla Y, Ortiz M. 2014.** Estudio de prevalencia de serovares de *Salmonella* en las granjas avícolas tecnificadas en el Perú. Lima: SENASA. 31 p.
26. **Zamudio ML, Meza A, Bailón H, Martínez J, Campos J. 2011.** Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 28: 128-135