

# DetECCIÓN RÁPIDA DE *Salmonella* spp. MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR CONVECCIÓN E INMUNOENSAJO DE FLUJO LATERAL

Chávez Almanza, A.F.<sup>1\*</sup> • González García, I.<sup>1</sup> • Figueroa López, A.M.<sup>1</sup> • Cantú Soto, E.U.<sup>1</sup>

*Palabras clave:* Especificidad, sensibilidad, ADN

*Key words:* Specificity, sensitivity, DNA

## Introducción

El género *Salmonella* está integrado de bacilos Gram negativos perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, a este género pertenecen algunos patógenos zoonóticos que representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; puede colonizar animales, humanos, plantas, y también se encuentra en el medio ambiente [1]. Se han identificado más de 2500 serotipos diferentes en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, a esta última, le sobresalen dos serotipos, *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* y *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium*. Estos dos serotipos se encuentran con frecuencia en alimentos contaminados, especialmente en la carne [2], y se consideran los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida

de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo, ya que son causantes de la enfermedad llamada salmonelosis, ocasionando gastroenteritis [3]. Esta enfermedad suele ser autolimitada y se caracteriza por fiebre, dolor abdominal, vómito y diarrea; niños menores de 5 años, ancianos y personas inmunocomprometidas corren el riesgo de una infección sistémica del patógeno [4].

Es importante realizar un buen control en la contaminación microbiana de los alimentos, para disminuir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), para esto se necesitan métodos de detección rápidos y sensibles, realizando un seguimiento eficaz de los microorganismos patógenos, específicamente la *Salmonella* [5].

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Calle 5 de febrero 818 sur, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México.

\* andres.chavez@itson.edu.mx



En la actualidad existen métodos para la identificación de microorganismos, conocidos como métodos tradicionales, como la inmunológica y los perfiles bioquímicos, pero son lentos y laboriosos, lo que repercute negativamente en su aplicación. Para contrarrestar estos problemas, se han empleado métodos moleculares, donde se destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), recibiendo el mayor interés debido a su precisión, sensibilidad y rapidez [1,2,6].

Una nueva herramienta de tipo molecular rápida y sensible es la PCR por convección (CPCR); la técnica emplea el uso de tres placas de calentamiento para desnaturalización, hibridación y extensión el cual genera convección en los tubos de PCR y al no requerir rampas de temperaturas hace que el tiempo de reacción se reduzca drásticamente [5].

Para complementar la rapidez y sensibilidad de la CPCR, se han desarrollado recientemente, dispositivos de ensayo de flujo lateral de ácidos nucleicos (NALF) [6], que permite una detección indirecta de los productos de PCR amplificados mediante el uso de anticuerpos contra etiquetas de oligonucleótidos específicos, como la carboxifluoresceína (FAM), la digoxigenina (DIG) y la biotina [7].

El objetivo de este estudio es estandarizar un método rápido y sensible para la detección in situ de *Salmonella* spp., mediante la combinación de CPCR y el inmunoensayo NALF.

## Metodología

### *Condiciones del cultivo.*

La cepa utilizada en este estudio fue *Salmonella enterica* ATCC 14028, la cual se encontraba criopreservada a -70 °C. La activación de la cepa se realizó mediante estría por agotamiento en agar tripticasa de soya (TSA) (Cat. 236950, BD®) y se incubó a 35-37 °C por 24 h. Se seleccionó una colonia aislada para inocular 10 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) (Cat. 211825, BD®) y se incubó a 35-37 °C por 24 h.

### *Extracción del ADN genómico.*

La extracción del ADN genómico de la cepa control de *Salmonella enterica* ATCC 14028, se realizó por medio de un extractor portátil de ácidos nucleicos Palm Tron™ E1, (Ahram BIOSYSTEM™, y se siguió la metodología del fabricante, que consiste en mez-

clar 200 µL de buffer Quick DE con 20 µL de la cepa incubada en TSB a 35°C por 24 h; consecutivamente se tomaron 5 µL de la mezcla anterior y se colocó en el tubo DE PALM PCR™ con 20 µL de reactivo DE, se centrifugó por 1 minuto a 8500 rpm en una centrifuga Ahram™ RX1, BIOSYSTEM, se colocaron los tubos en el equipo Palm Tron™ E1 por 6 minutos y se centrifugó a 8500 rpm por 1 minuto, tomando 5 µL del sobrenadante para la PCR; el resto de la extracción se mantuvo en almacenamiento a -20°C.

Se determinó la concentración y pureza del ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™); se evaluó la integridad mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.33 mg/mL y se documentó el resultado con el sistema Minibis Pro DNR (sistemas Bio-Imaging™); la especificidad de los oligonucleótidos se evaluó de la misma manera con electroforesis en gel de agarosa.

### *Condiciones de la reacción cPCR.*

La CPCR se realizó en un volumen de 20 µL, conteniendo 4 µL de 5X PalmTaq™ Express Mastex mix (suplementada con 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP's, y 0.8 U Taq Polimerasa) (Ahram Biosystems™, Part No. RK2010) y 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM cada uno) marcados con biotina y fluoresceína, respectivamente [5] (Tabla 1). Se utilizó 1 µL (20 ng) de ADN genómico como templado. La CPCR se realizó en un termociclador portátil operado por batería y de convección térmica PALM PCR (Mod. G3, Ahram Biosystem™). La velocidad utilizada fue turbo 3 (T3) con una temperatura de alineamiento de 58°C y 35 ciclos (11 minutos). El ensayo se realizó por triplicado.

### *Especificidad y sensibilidad de cPCR.*

La especificidad de los oligonucleótidos empleados en la identificación de *Salmonella* spp., se evaluó en nueve diferentes muestras de ADN genómico de las siguientes cepas: *Salmonella* ATCC 14028, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *E. coli* O157:H7-CIBNOR (cepa H28-1), *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y agua grado molecular como control negativo.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en el ensayo cPCR.

| Nombre    | Secuencia 5' - 3'           | Ta (°C) | Amplicón (pb) | Especie                |
|-----------|-----------------------------|---------|---------------|------------------------|
| SPP-FAM f | Biosg-CACGTCGGGCAATTCGT     | 56.2    | 241           | <i>Salmonella</i> spp. |
| SPP-FAM r | 6-FAM-CGCTTTCCCTTTCCAGTACGC | 56.3    |               |                        |

Ta: Temperatura de alineamiento. pb: pares de bases

La sensibilidad del ensayo se determinó mediante el promedio del tamaño del genoma en pares de bases, usando 5 cepas de *Salmonella* (ATCC 14028, ATCC 35640, ATCC BAA1715, ATCC BAA1585, ATCC BAA1582) obtenidas del portal de genomas ATCC <https://genomes.atcc.org/>. El promedio fue utilizado para determinar el número de copias de ADN presentes en 1  $\mu$ l (20 ng/ $\mu$ l) con ayuda de la calculadora científica del programa “*Science Primer*” <https://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>.

Se realizaron diluciones seriadas partiendo de  $10^6$  hasta  $10^0$ . A cada dilución se le realizó un cPCR, con el fin de identificar el número mínimo de copias que el termociclador portátil PALM PCR (Mod. G3, Ahram Biosystem™) puede amplificar. Los productos de cPCR fueron analizados con una electroforesis en gel de agarosa, y simultáneamente se utilizó el inmunoensayo NALF (*Nucleic Acid Lateral Flow*) (Ahram Biosystems™). Este proceso se realizó por triplicado para tener validez estadística.

## Resultados y discusión

La cPCR se estandarizó con los oligonucleótidos específicos (Tabla 1) para la detección de *Salmonella* spp., así mismo en las reacciones de especificidad solo se amplificó en la cepa control de *Salmonella* spp obteniendo un amplicón de 241 pb. El resto de las cepas analizadas no mostraron un amplicón (Figura 1A), también se corroboró con los bioensayos NALF, observándose claramente líneas rojas, pero no se desarrolló ninguna línea de color detectable en las otras alícuotas de ADN genómico utilizadas como se muestra en la Figura 1B, trabajos similares de Kim y colaboradores [8] demostraron que un ensayo adecuado para su uso in situ, debe ser lo suficientemente rápido, sensible, y no requerir un equipo complejo, tal es el caso del

PALM PCR (Mod. G3, Ahram Biosystem™) usado en esta investigación, además de una revelación de resultados utilizando los bioensayos NALF, debido a su fácil transportación y manejo.

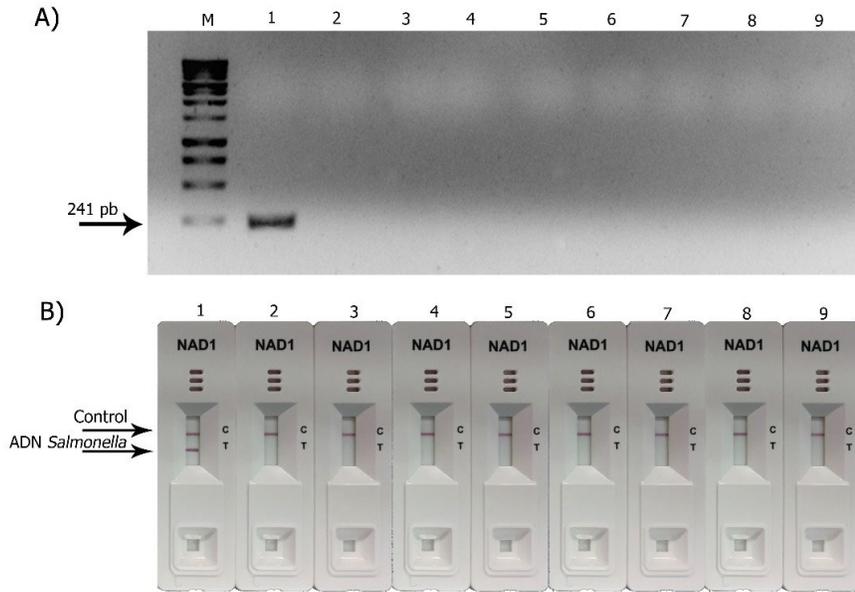
Se determinó la sensibilidad para la cPCR, mezclando el ADN genómico diluido de  $3.753 \times 10^6$  hasta  $3.753 \times 10^0$  número de copias, a una velocidad T3 con una temperatura de alineamiento de  $58^\circ\text{C}$  y 35 ciclos equivalente a 11 minutos; donde se aprecia una amplificación del ADN hasta  $3.753 \times 10^3$  en el gel de agarosa al 1%, como se muestra en la Figura 2A. Sin embargo, al momento de revelarlo con los bioensayos NALF, se observó una línea roja tenue en  $3.753 \times 10^2$  (Figura 2B), confirmando la sensibilidad de estos Inmunoensayos. Estudios similares realizados por Kim[8], demostraron una sensibilidad del equipo menor, amplificando un nivel de copia de 100, usando la cepa *Salmonella* spp. ATCC 14028, con velocidad de T1, 30 ciclos en un tiempo de 21 minutos.

## Conclusión

En este estudio se estandarizó la detección de *Salmonella* spp., por el método de cPCR a una velocidad de 11 minutos, con una sensibilidad de detección de 375 copias de ADN genómico, complementado con la detección rápida (5 minutos) por medio de bioensayos NALF, la cual es una herramienta molecular que puede ser aplicada en industrias alimentarias, por su fácil manejo, rapidez y sensibilidad del método.

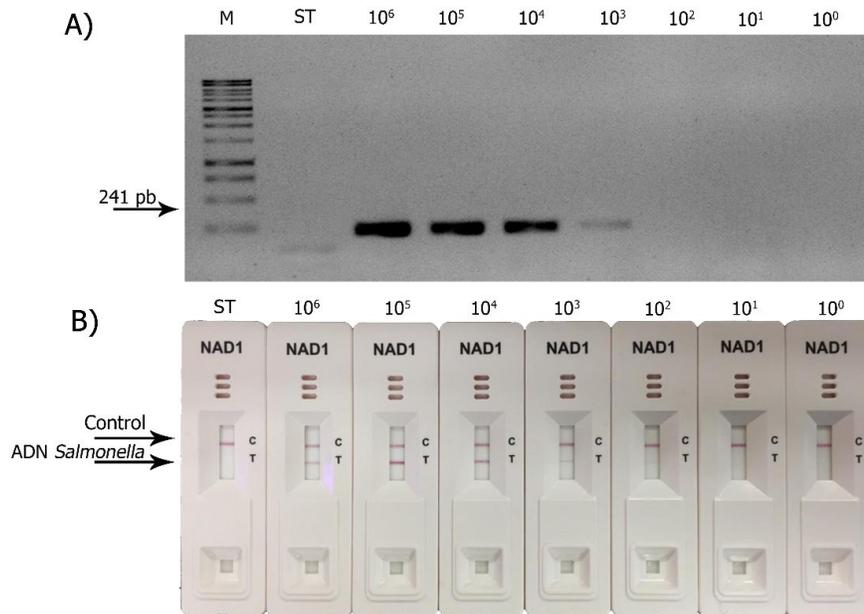
## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo brindado para el desarrollo del proyecto a la empresa BIOERA México S.A. de C.V., distribuidor exclusivo en México de Ahram Biosystems™.



**Figura 1.** Especificidad de los oligonucleótidos para *Salmonella* spp.

M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Cat. G571A, PROMEGA); Carril 1. ADN *Salmonella* ATCC 14028; Carril 2. *Listeria innocua* ATCC 33091; Carril 3. *Listeria ivanovii* ATCC 19119; Carril 4. *Escherichia coli* O157:H7 (cepa H281); Carril 5. *Escherichia coli* ATCC 25922; Carril 6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; Carril 7. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; Carril 8. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; Carril 9. Sin templado (agua ultra pura); Control: Control interno del inmunoensayo NALF.



**Figura 2.** Detección de *Salmonella* ATCC 14028 mediante cPCR y el ensayo NALF1.

Los amplicones de ADN se analizaron mediante A) electroforesis en gel de agarosa y B) Ensayo NALF. MM: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Cat. G571A, PROMEGA); ST: Sin templado (agua ultra pura); Control: Control interno del inmunoensayo NALF.

## Referencias

1. He X, Xu X, Li K, Liu B, Yue T. Identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and variants using a novel multiplex PCR assay. *Food control*. 2016;65:152-159.
2. Liu B, Zhou X, Zhang L, et al. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control*. 2012;27(1):87-93.
3. OMS. *Salmonella* (no tifoidea). *Organización Mundial de la Salud*. 2018;
4. Knodler LA, Elfenbein JR. *Salmonella enterica*. *Trends in microbiology*. 2019;27(11):964-965.
5. Kim T-H, Hwang HJ, Kim JH. Ultra-fast on-site molecular detection of foodborne pathogens using a combination of convection polymerase chain reaction and nucleic acid lateral flow immunoassay. *Foodborne pathogens and disease*. 2018;16(2):144-151.
6. Kamphee H, Chaiprasert A, Prammananan T, Wiriya-chaiporn N, Kanchanatavee A, Dharakul T. Rapid molecular detection of multidrug-resistant tuberculosis by PCR-nucleic acid lateral flow immunoassay. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137791.
7. Kim T-H, Hwang HJ, Kim JH. Optimization of ultra-fast convection polymerase chain reaction conditions for pathogen detection with nucleic acid lateral flow immunoassay. *International Journal of Oral Biology*. 2019;44(1):8-13.
8. Kim T-H, Hwang HJ, Kim JH. Development of a novel, rapid multiplex polymerase chain reaction assay for the detection and differentiation of *Salmonella enterica* serovars enteritidis and typhimurium using ultra-fast convection polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2017;14(10):580-586.