

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CUATRO PCRs PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA EN GANGLIOS LINFÁTICOS PORCINOS

Sánchez, S.¹, San Román, B.¹, Garrido, V.¹, Abuelo, A.¹, Asensio, A.C.¹, Vico, J.P.², Mainar-Jaime, R.C.², Grilló, M.J.^{1*}

¹Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra). Campus de Arrosadía. 31006. Pamplona.

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón. Avda. Montañana, 930. 50059. Zaragoza. E-mail: mariajesus.grillo@navarra.es

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una de las principales zoonosis extendida, con 21 millones de casos registrados y más de 600.000 muertes por año. En Europa, está reconocida como la segunda zoonosis más frecuente en número de casos, sólo superada por la campilobacteriosis, y la principal causa de mortalidad debida a infecciones de origen alimentario (EFSA 2009). El porcino infectado de forma subclínica y sus productos derivados están estrechamente asociados a los casos de gastroenteritis aguda por Salmonella. Por ello, las autoridades sanitarias de la Unión Europea, a través de la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos (DOUE 2003) y del Reglamento (CE) N° 2160/2003 sobre el control de la Salmonella y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos (DOUE 2007), han iniciado programas de control de la salmonelosis porcina que contemplan la realización de estudios de prevalencia en animales de matadero, mediante cultivo microbiológico de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), siguiendo la norma ISO 6579 (ISO 2005). Este método presenta ciertos inconvenientes (lento, caro, laborioso, gran manipulación del patógeno, complejidad técnica y baja sensibilidad) que recomiendan el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico. Para ello, se han propuesto diversos procedimientos de diagnóstico molecular, con resultados discrepantes, por lo que no existe un método molecular con suficiente sensibilidad y especificidad para ser recomendado como método de referencia (Levin 2009). El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar la utilidad de nuevas PCRs con respecto al cultivo recomendado en la norma ISO 6579, para muestras de GLM porcinos, como técnica alternativa o complementaria ("screening") al cultivo microbiológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de las PCRs, se seleccionaron 4 genes, 2 cromosómicos (A y B) y 2 plasmídicos (C y D) altamente conservados en Salmonella spp. y se diseñaron cebadores específicos para cada gen. Los genes amplificados, cebadores utilizados y otros detalles sobre las PCRs utilizadas no se describen por formar parte de un estudio sometido a patentabilidad. Tras comprobar el correcto funcionamiento de los cebadores con las cepas de referencia *S. Typhimurium* 14028 (STM) y *S. Enteritidis* 3934 (SE), se fijaron las condiciones óptimas de PCR, a partir de alícuotas de 1 mL de suspensiones bacterianas preparadas en PBS o en agua de peptona tamponada (BPW), que contenían entre 10^{10} y <4 UFC/mL, en diluciones decimales realizadas en el mismo diluyente. Las suspensiones de STM y SE preparadas en BPW fueron incubadas a 37°C, durante 24 horas, para determinar en paralelo el crecimiento in vitro de Salmonella (UFC/mL) en este medio y el límite de detección (LD) de las PCRs. Además, se analizó la especificidad de las 4 PCRs frente a una colección de 38 cepas de 22 especies bacterianas aisladas como microbiota acompañante habitual junto a Salmonella spp. por el método ISO 6579 (ISO 2005). A continuación, se analizó la utilidad de las 4 PCRs para detectar 132 cepas pertenecientes a 37 serotipos de Salmonella (50 cepas *S. Typhimurium*, 21 de su variante monofásica *S. 4,12:i:-*, 17 *S. Rissen*, 10 *S. Enteritidis*, 2 *S. arizonae* y 1 cepa de los restantes 32 serotipos menos frecuentes) aisladas de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) de porcino de engorde de Aragón (Vico et al. 2011). Para ello, se utilizaron suspensiones con 10^7 UFC/mL de cada cepa en PBS, se extrajo DNA total a partir de 1 mL de suspensión (Oliveira et al 2005), se cuantificó el DNA obtenido por espectrofotometría a 260 nm y los productos de PCR

amplificados se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (0,4 µg/mL). Finalmente, se determinó la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de cada PCR y de las 4 PCRs consideradas conjuntamente, para detectar *Salmonella* spp. en 320 muestras de GLM porcinos cultivadas (37°C, 24 h) en BPW, con respecto a los resultados (107 muestras positivas y 213 negativas) obtenidos con el método ISO. Para el estudio bacteriológico de los casos discordantes (muestras PCR+ e ISO-), se realizó un segundo enriquecimiento (37°C, 24 horas) en BPW (1:10) de alícuotas de 1 mL de cada muestra conservadas a -20°C, seguido de los procedimientos bacteriológicos del método ISO 6579.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En condiciones de laboratorio, las 4 PCRs detectaron entre 10^3 y 10^9 UFC/mL de las cepas STM y SE preparadas tanto en PBS como en BPW. El enriquecimiento en BPW, permitió detectar *Salmonella* tras 6 horas de incubación a 37°C en las muestras que inicialmente contenían <4 UFC/mL (indetectables por microbiología), por lo que el LD de la técnica puede considerarse adecuado. Por otra parte, ninguna de las PCRs desarrolladas amplificó los fragmentos de DNA esperados con las 38 cepas de contaminantes analizadas, si bien algunas de ellas mostraron bandas de DNA de tamaño mucho mayor.

Cuando se analizaron las 132 cepas de 37 serotipos de *Salmonella*, las PCRs de los genes A y B detectaron mayor número de cepas (131 -99,2%- y 129 -97,7%-, respectivamente) que las de los genes C (95 cepas; 72%) y D (71 cepas; 53,8%), sin observarse un efecto debido al serotipo.

Con cultivos de GLM porcinos en BPW, la PCR para el gen A detectó 101 de las 107 muestras detectadas por el método ISO, una Sensibilidad Relativa (SeR) del 94,4% (IC95%=90%-98,7%), mientras que la SeR de las PCRs para los genes B, C y D fue tan sólo del 61,7% (IC95%=52,5%-70,9%), 63,6% (IC95%=54,4%-72,7%) y 58,9% (IC95%=49,6%-68,2%), respectivamente. Sin embargo, la combinación de las 4 PCRs mostró una Se del 97,2% (IC95%=94,1%-100%) mejorando significativamente ($p < 0,0001$) la utilidad diagnóstica de las PCRs B, C y D individuales. Dicha combinación permitió detectar *Salmonella* no sólo en 104 de las 107 muestras ISO+ sino también en otras 26 muestras que habían resultado negativas en el cultivo ISO. Para determinar si se trataba de falsos positivos de las PCRs, se realizó un segundo enriquecimiento en BPW de las 26 muestras discordantes (PCR+, ISO-). A pesar del pequeño volumen analizado (1 mL) y que la congelación de las muestras se había realizado sin crioprotectores, se aisló *Salmonella* en 17 de las 26 (65,4%) muestras analizadas, indicando una mayor SeR (97,6%; IC95%=94,9%-100%) que el cultivo ISO (95,4%) y sugiriendo que la sensibilidad diagnóstica general de las PCRs combinadas era superior a la del cultivo ISO.

En conclusión, la combinación de las 4 PCRs descritas puede resultar de gran utilidad como método de screening en muestras de GLM dada su mejor sensibilidad diagnóstica comparada con el cultivo según la norma ISO 6579. Además, puede ser utilizado en estudios epidemiológicos para la identificación de animales infectados, de una forma rápida (dentro de una jornada laboral), sencilla, efectiva y con mínima manipulación de la muestra.

Tabla 1. Detección de *Salmonella* (número de muestras) en GLM porcinos cultivados en BPW, mediante la combinación de las 4 PCRs descritas (PCR) frente al cultivo microbiológico descrito en la norma ISO 6579 (ISO; tabla izquierda) o tras un segundo cultivo bacteriológico (2° C; tabla derecha).

	ISO +	ISO -		2° C +	2° C -	
PCR +	104	26	130	121	9	130
PCR -	3	187	190	3	187	190
	107	213	320	124	196	320

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOUE (2003a) Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. [WWW document]. URL <http://www.boe.es/doue/2003/325/L00031-00040.pdf>The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. EFSA J 223: 1-312.
- ISO. 2005. International Organisation for Standardisation. ISO 6579:2002/DAM. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp. Annex D. Geneve, Suiza.
- Levin, R.E. 2009. Review. Food Biotech, 23(4):313-367.
- Oliveira, C.J.B., Oliveira, L.F., Carvalho, S. & Naves, P.E. 2005. Rev. Port. Ciencias Vet. 100: 193-198.
- Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Román, Grilló, M.J. & Mainar-Jaime, R.C. 2011. J Food Protect (2011, in press).

Agradecimientos: El trabajo ha sido financiado por Gobierno de Navarra (proyectos IIM10841.R11-EP11 y IIQ14064.R11) e INIA (RTA2007-00065-00-00). Las becas de S.S. y A.A han sido financiadas por el programa Erasmus Mundus 18 y el CSIC (JAE-Intro), respectivamente.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF COMBINED PCRs FOR DETECTING SALMONELLA IN SWINE LYMPH NODES

ABSTRACT: Salmonellosis is one of the major zoonoses worldwide extended, frequently transmitted by subclinically infected pigs. Thus, EU health authorities have initiated salmonellosis control programs including prevalence studies in pigs by microbiological culture of lymph nodes (LN) following the ISO 6579 method. This method has some disadvantages that recommend the development of new diagnostic tools. The aim of this study was to develop and evaluate the usefulness of new PCRs for detecting Salmonella in LN pig samples, by amplifying 2 chromosomal (A and B) and 2 plasmidic (C and D) genes highly conserved in Salmonella. These PCRs were evaluated (i) in lab conditions; (ii) against 38 contaminants; (iii) against 132 Salmonella strains of 37 serotypes; and (iv) with 320 swine LN samples. Results shown that: (i) the four PCRs were specific for Salmonella; (ii) PCR-A and PCR-B had more sensitivity than PCR-C and PCR-D, unrelated to the serotype; (iii) PCR-A showed 94.4% SeR vs. the ISO method, while it was below 63.6% for the other genes; and (iv) best results of SeR was obtained by considering the 4 PCRs jointly, allowing to detect Salmonella in 26 ISO- samples, 17 (65.4%) of which resulted positive after a second culture. In conclusion, the combined PCRs showed higher diagnostic sensitivity, indicating its usefulness as a complementary or alternative method to the ISO.

Keywords: Salmonella, Swine, Lymph nodes, Diagnosis, Sensitivity.