

Electroforesis de campo eléctrico pulsado en la tipificación molecular de cepas aisladas de un brote de Salmonelosis ocasionado por consumo de queso contaminado con *Salmonella* Javiana

Pulse Field Gel Electrophoresis in molecular typification of strains isolated from a Salmonellosis outbreak caused by consumption of Salmonella Javiana contaminated cheese

Elsa S Toro¹, Astrid O Miró², Carmen I Ugarte¹ Francisco J Larrea³

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue confirmar por Electroforesis de Campo Eléctrico Pulsado (PFGE) que la *Salmonella* aislada del alimento implicado en el brote (queso blanco) fue la responsable del evento.

La muestra de queso blanco presentó elevado recuento de coliformes, *E. coli* y *S. aureus*, además, presencia de *Salmonella* spp., lo que indico condiciones sanitarias inadecuadas y posible contaminación de origen fecal.

Para la confirmación de las cepas sospechosas de *Salmonella* spp, aisladas de los pacientes y del alimento, se utilizaron técnicas bioquímicas convencionales, la serotipificación se realizó siguiendo el esquema de White-Kauffmann-Le Minor y la sensibilidad a los antimicrobianos (Ampicilina, Trimetoprim-Sulfametoxazole, Ciprofloxacina, Amoxicilina, Ac. Clavulánico, Cloranfenicol, Ceftriaxone y Tetraciclina) por la técnica Kirby-Bauer.

Las cepas bacterianas de *Salmonella* spp aisladas fueron identificadas como *Salmonella* Javiana [1,9,12:l, z₂₈:1,5] y resultaron sensibles a todos los antibióticos probados.

La Tipificación Molecular de las cepas, se realizó por PFGE, según protocolo estandarizado de PulseNet para *Salmo-*

ABSTRACT

The aim of this work was confirmation through Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) that *Salmonella* isolated from the food implicated in the outbreak (white cheese) was responsible for the event.

The white cheese sample showed a high count of Coliforms, *E. coli* and *S. aureus*. Moreover, *Salmonella* was present, which indicated inadequate sanitary conditions and possible fecal contamination.

The suspected *Salmonella* strains isolated from patients and the food sample, were confirmed using conventional biochemical techniques, serotyping according to the White-Kauffmann-Le Minor scheme and antibiotics sensibility (Ampicillin, Trimetoprim-Sulfametoxazole, Ciprofloxacin, Amoxicillin, Clavulanic Acid, Cloranfenicol, Ceftriaxone and tetracyclin) following Kirby- Bauer's technique.

The *Salmonella* strains were identified as *Salmonella* Javiana [1,9,12:l, z₂₈:1,5] and were sensitive to all the antibiotics tested.

The molecular typing of the strains was performed using PFGE, according to the PulseNet standardized protocol for *Salmonella*. The pattern analysis was studied using Bionu-

¹ Departamento de Bacteriología/ División de Diagnóstico/ Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Apdo. 60412, Oficina del Este, Ciudad Universitaria. Los Chaguaramos. Caracas. toroaraujo@yahoo.es.

² Departamento de Microbiología de Alimentos/ División de Control de Alimentos/ Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Apdo. 60412, Oficina del Este, Ciudad Universitaria. Los Chaguaramos. Caracas. astridmiro@yahoo.es , amiro@inhrr.gob.ve.

³ Ministerio del Poder Popular para la Salud, Dirección de Epidemiología y Análisis Estratégico. Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Caracas.

nella y el análisis de los patrones se estudio utilizando el programa BioNumerics, versión 4.0, lo cual mostró que los aislados de *Salmonella* Javiana procedentes tanto de pacientes como del alimento tenían idéntico patrón de restricción, en tamaño y número de fragmentos. La ocurrencia de un patrón único de PFGE (Coeficiente de similitud 100%) entre los aislados permitió demostrar que el queso contaminado con *Salmonella* Javiana fue el responsable del brote familiar.

Palabras clave: *Salmonella* Javiana, tipificación molecular, electroforesis en campo eléctrico pulsado, epidemiología molecular, enfermedad transmitida por alimentos, Salmonelosis.

merics program, version 4.0, which showed that the *Salmonella* Javiana isolates from patients as the food sample had an identical restriction pattern in size and fragments number. The incidence of a unique pattern of PFGE (similarity coefficient 100%) between isolates demonstrated that the cheese contaminated with *Salmonella* Javiana was responsible for the family outbreak.

Key words: *Salmonella* Javiana, molecular subtyping, pulse field gel electrophoresis, molecular epidemiology, food-borne disease, salmonellosis.

INTRODUCCIÓN

Salmonella spp es un patógeno importante como agente causal de enfermedades de transmisión alimentaria, puede encontrarse como flora intestinal de aves, reptiles y mamíferos. Se propaga a los seres humanos a través del consumo de alimentos contaminados tales como carnes crudas, pollo, huevos, leche y derivados lácteos, pescados y mariscos, productos de origen vegetal como berros, semillas germinadas, jugos de naranja y manzana no pasteurizados. Característicamente la enfermedad –salmonelosis– ocasionada por especies de *Salmonella* diferentes a *S. Typhi*, se presenta con dolores y calambres abdominales, diarrea, escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos y malestar general 12 a 72 horas después de la infección, la duración de los síntomas normalmente es de 4 a 7 días, en personas débiles con problemas inmunológicos subyacentes, la bacteria puede invadir el torrente sanguíneo y causar infecciones que ponen en peligro la vida.

En la investigación de brotes de enfermedad transmitida por alimentos (ETA) resulta difícil relacionar los aislados de origen humano, de alimentos y de ambiente por técnicas fenotípicas convencionales de tipificación. El uso de métodos de tipificación molecular se inició en 1980 con el desarrollo de métodos simples de aislamiento de ADN bacteriano y uso de enzimas de restricción. La separación de los fragmentos generados en base al tamaño "Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis" (RFLP), por electroforesis en gel de agarosa, da lugar a patrones de restricción de ADN característicos para un subtipo particular. Estos métodos tienen mayor

poder discriminatorio que los convencionales y han sido empleados con éxito en investigaciones epidemiológicas de brotes de ETA originados por consumo de alimentos contaminados con patógenos como *E. coli* 0157:H7 (1,2), *Salmonella* spp (3, 4, 5), *Listeria monocytogenes* (6). La técnica de PFGE es considerada actualmente el "gold standard" de los métodos de tipificación molecular (7). El objetivo de este trabajo es confirmar por PFGE que la *Salmonella* aislada del alimento implicado (queso blanco) ocasiono el brote estudiado.

MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS

Para efectos de Vigilancia Epidemiológica se considera un brote a un episodio en el cual dos o más personas presentan una enfermedad similar después de ingerir alimentos, incluida el agua, del mismo origen y donde la evidencia epidemiológica o el análisis de laboratorio implica a los alimentos o al agua como vehículos de la misma. Cuando este evento ocurre entre personas convivientes se denomina Brote Familiar de ETA.

Características del Brote: Se inicia el 28-05-05 en el sector Los Pilones, Población de Urraca, Municipio Ura-coa, del Estado Monagas, se involucraron 7 personas (2 niños, 3 adultos y 2 ancianos) de un mismo grupo familiar, quienes presentaron un cuadro clínico caracterizado por: fiebre, diarrea, vómitos, dolor abdominal y cefalea; con un período de incubación promedio de 11 horas (7 a 14 horas) posterior al consumo del alimento sospechoso: queso blanco criollo, el cual fue consumido en el hogar de las personas afectadas. El reporte de la ETA fue realizado el 29 de mayo por el Hospital tipo I Ura-coa.

La muestra del alimento implicado y las cepas aisladas de los pacientes afectados fueron remitidas a los Departamentos de Microbiología y Química de Alimentos, y Bacteriología, respectivamente, del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" para los análisis correspondientes.

Análisis del queso blanco: Para evaluar la calidad sanitaria y detectar presencia de posibles agentes patógenos, se realizaron análisis siguiendo la Norma Venezolana COVENIN correspondiente señalada en cada caso: Recuento de coliformes y de *Escherichia coli*, como indicadores de calidad higiénica y posible contaminación de origen fecal (N° 3276-97), Recuentos de *Staphylococcus aureus* (N° 1292-89) y *Bacillus cereus* (N° 1644-93), detección de *Salmonella* spp (N° 1282-89), determinación de cloruros (N° 369-82) y acidez (N° 658-97). La determinación de enterotoxinas estafilocócicas (A-B-C-D) se realizó utilizando el Kit RPLA- OXOID y la presencia de sustancias conservadoras siguiendo la metodología recomendada JAOAC, vol. 52, N° 4, 1969.

Análisis de las cepas bacterianas: La confirmación de 6 cepas sospechosas de *Salmonella* spp, aisladas de coprocultivos de pacientes involucrados en el brote y 1 cepa de *Salmonella* spp. aislada de queso blanco criollo, fue realizada, por técnicas bioquímicas convencionales (8). La serotipificación de los aislados fue realizada en base a reacciones de aglutinación entre antígenos somáticos O y flagelares H de fase I y II con antiseros específicos (Difco Laboratorios. Detroit. Michigan), siguiendo el esquema de White-Kauffmann-Le Minor (9). La sensibilidad a los antimicrobianos recomendados para este tipo de microorganismo fue realizada por Kirby-Bauer, técnica de difusión en agar Mueller-Hinton, siguiendo los criterios de interpretación de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2005) (10).

Tipificación Molecular de las cepas: Se realizó por Electroforesis de Campo Eléctrico Pulsado (PFGE), según protocolo estandarizado de PulseNet para *Salmonella* (11).

Preparación de ADN genómico: Colonias aisladas de cada una de las cepas del brote y de la cepa de referencia fueron crecidas en agar tripticasa de soya durante 24 horas, se preparó una suspensión de las células en buffer (EDTA 100 mM, Tris 100 mM, pH 8.0), a 20% de tramitancia en el colorímetro Vitek de BioMérieux, 200 µl

de esta suspensión bacteriana fueron mezclados con 200 µl de agarosa SeaKem Gold de alta resolución 1%: SDS al 1% en buffer TE y se agregaron 10 µl de proteína K (20mg/ml), doscientos microlitros de la mezcla fueron distribuidos con una pipeta en moldes desechables (Bio-Rad laboratorios).

La lisis celular "in situ" fue realizada colocando los bloques de agarosa solidificados en tubos que contenían 5 ml de buffer de lisis (Tris50 mM :EDTA 50 mM, pH 8, Sarcosyl 1%) y 25 µl de proteína K (20 mg/ml) e incubados en un baño de agua con agitación a 54 °C por 2 h. Seguidamente los bloques fueron lavados para eliminar los restos celulares, dos veces con agua estéril ultrapura a 50 °C y ocho veces con TE (Tris10 mM-EDTA 1mM, pH 8) a 50 °C, durante 15 minutos en baño de agua con agitación a 50 °C, quedando el ADN embebido en la agarosa, listo para tratamiento con enzimas de restricción.

Digestión del ADN con la enzima Xba I: Se realizó en segmentos de bloques de agarosa de 2.0 milímetros con 30 U de la enzima, siguiendo las recomendaciones del fabricante, durante 2 h a 37 °C. Los bloques digeridos fueron colocados en un gel de agarose Seakem Gold al 1% en TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA, pH 8) y la electroforesis fue realizada utilizando buffer TBE 0,5X, bajo las siguientes condiciones: tiempo inicial 2,2 segundos, tiempo final 63,8 segundos, ángulo de 120°, temperatura de 14 °C, voltaje 6V/cm, con un tiempo total de corrida de 19 horas a 14°C (equipo CHEF-DR III System, Bio Rad).

El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,001 mg/ml) durante 30 minutos y lavado 6 veces con agua destilada en agitación suave durante 30 minutos cada vez. La imagen del gel en formato tiff fue obtenida utilizando un equipo de fotodocumentación (Gel Doc. Bio-Rad) con luz ultravioleta.

Análisis de los datos: El análisis de los patrones de PFGE fue realizado utilizando el programa computarizado de análisis BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) (12). La cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 fue utilizada como estándar de referencia para normalizar el gel (13). Las bandas fueron asignadas manualmente, el coeficiente de similitud de Dice fue aplicado para comparar los patrones de macroresolución. Para visualizar mejor la relación existente entre los aislados se construyó un dendograma empleando el método de los promedios aritméticos no ponderados

(UPGMA unweighted pair group method with arithmetic averages) utilizando un parámetro de optimización de 1,5% y 1,5% de tolerancia en la posición de las bandas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

La muestra de queso blanco presentó características organolépticas normales, se obtuvo elevado recuento de coliformes ($1,7 \times 10^6$ ufc/g) y de *Escherichia coli* (más de $1,5 \times 10^6$ ufc/g), presencia de *Salmonella* spp, elevado recuento de *S. aureus* ($3,3 \times 10^6$ ufc/g) y no se logró demostrar la presencia de enterotoxinas estafilococcicas A,B,C,D. No se detectó presencia de *B. cereus*. (Menos de $1,0 \times 10^2$ ufc/g).

No se encontró presencia de sustancias conservadoras, los valores obtenidos de cloruro de sodio (1,61 g/100g) y acidez (8,93 ml de NaOH 1N/100g, 0,80 g ácido láctico/100g) están dentro de los límites normales establecidos para este tipo de productos según Norma Venezolana COVENIN N° 3821-03 "Queso Blanco".

La presencia de Coliformes en el queso blanco revela inadecuadas condiciones a las cuales pudo estar expuesto el alimento, insuficiencia en la pasteurización de la leche o ausencia de la misma, contaminación durante o luego del proceso de elaboración. Los elevados niveles de *Escherichia coli* indican posible contaminación de origen fecal. Varios autores señalan que el alto valor de *S. aureus* está relacionado con la concentración inicial del microorganismo en la leche utilizada para la elaboración del queso, fallas en la actividad de los cultivos lácticos utilizados (en caso de ser agregados) e inadecuadas condiciones sanitarias durante la elaboración y comercialización del producto, la cantidad de *S. aureus* encontrada en el queso blanco representa un riesgo para los consumidores por la posible producción de enterotoxinas (14).

En quesos blancos fabricados en el País se ha reportado una incidencia de *Salmonella* spp de 2,1% (14), la presencia de este microorganismo no se permite en alimentos para consumo humano, según lo establecido en las Normas Venezolanas COVENIN y la ICMSF. Estos resultados indican calidad higiénica deficiente del alimento y riesgo para la salud de los consumidores por la presencia de estos patógenos.

Las cepas bacterianas de *Salmonella* spp aisladas de pacientes y del alimento implicado en el brote fueron

identificadas por métodos convencionales como *Salmonella* Javiana [1,9,12:l, z₂₈:1,5] y resultaron sensibles a todos los antibióticos utilizados (Ampicilina, Trimetoprim-Sulfametoxazole, Ciprofloxacina, Amoxicilina, Ac. Clavulánico, Cloranfenicol, Ceftriaxone y Tetraciclina).

La tipificación molecular de las cepas por PFGE mostró que los aislados de *Salmonella* Javiana procedentes tanto de pacientes como del alimento tenían idéntico patrón de restricción, en tamaño y número de fragmentos (Figura 1).

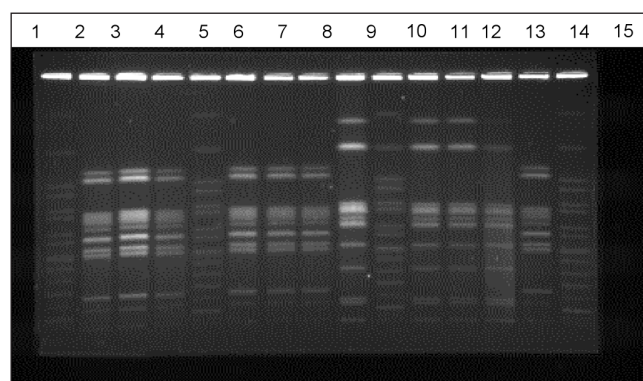


Figura 1: Electroforesis de Campo Eléctrico Pulsado (PFGE) del ADN cromosomal de las cepas de *Salmonella* Javiana aisladas de pacientes (casos) y del alimento implicado (queso blanco), digeridos con la endonucleasa de restricción *Xba* I. Cepas de casos brote familiar de ETA; carriles 2, 3, 4, 6, 7 y 8. En los carriles 9, 11, 12, 13 se observan aislados analizados en este gel que corresponden a otros brotes. Cepa de Queso blanco (alimento) brote familiar, carril 14. Marcador "universal" de Referencia *Salmonella* Braenderup (H9812) digerida con *Xba*I, carriles 1, 5, 10, 15.

La ocurrencia de un patrón único (Coeficiente de similitud 100%) de PFGE entre los aislados del alimento implicado y los aislados de pacientes permitió demostrar que el queso contaminado con *Salmonella* Javiana fue el responsable del brote familiar (Figura 2), brotes de ETA causados por este serovar también fue reportado por George Harvey y col (1998)(3).

Durante la investigación del brote se evidenciaron algunas limitaciones del Sistema de Vigilancia de las ETA no pudiéndose identificar los factores que contribuyeron a la pérdida de la inocuidad del alimento, la fuente de infección, ni otros casos que pudieran estar asociados al consumo del queso. Este brote ejemplariza la necesidad de incluir dentro del sistema de vigilancia de las ETA, la

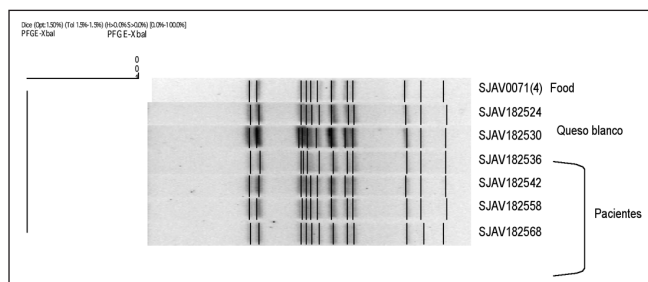


Figura 2: Dendograma de la imagen tiff del gel mostrando el análisis de los aislamientos de *Salmonella* Javiana procedentes de pacientes y del alimento implicado (queso blanco). El análisis de los patrones de PFGE fue realizado utilizando el programa computarizado BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths), aplicando el coeficiente de similitud de Dice.

investigación de patógenos que pueden utilizar alimentos como vehículos de transmisión, de ahí la importancia del desarrollo de una red de laboratorios de bacteriología integrados a la red de subtipificación molecular, como parte de la red de vigilancia nacional para las ETA. Adicionalmente, un brote de ETA se debe considerar una emergencia epidemiológica, de notificación inmediata. Es necesario realizar la investigación de éste tipo de brotes, a la brevedad posible con la integración de los equipos de Epidemiología, Higiene de los Alimentos y el Laboratorio de referencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, Gerencia Sectorial de Registro y Control del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Contraloría Sanitaria y Dirección de Higiene de los Alimentos, Maturín, Edo. Monagas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- (1) Barrett T, Lior H, Green J, Khakhria R, Wells J, Bell B, et al. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. J Clin Microbiol. 1994 December; 32(12): 3013-3017.
- (2) Johnson JM, Weagant SD, Jinneman KC, Bryant JL. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-borne outbreak. Appl Environ Microbiol. 1995 Jul; 61(7): 2806-2808.
- (3) Lee R, Peppe J and George H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Genomic Digests Demonstrates Linkages

among Food, Food Handlers, and Patrons in a Food-Borne *Salmonella* Javiana Outbreak in Massachusetts Clin Microbiol. 1998 January; 36(1): 284-285.

- (4) Werber D, Dreesman J, Feil F, van Treeck U, Fell G, Ethelberg S, et al. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate BMC Infect Dis. 2005; 5:7.
- (5) Proctor M, Hamacher M, Tortorello M, Archer J, Davis J. Multistate Outbreak of *Salmonella* Serovar Muenchen Infections Associated with Alfalfa Sprouts Grown from Seeds Pretreated with Calcium Hypochlorite J Clin Microbiol. 2001 October; 39(10): 3461-3465.
- (6) Graves L, Hunter S, Ong A, Schoonmaker-Bopp D, Hise K, Kornstein L et al. Microbiological Aspects of the Investigation That Traced the 1998 Outbreak of Listeriosis in the United States to Contaminated Hot Dogs and Establishment of Molecular Subtyping-Based Surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network. J Clin Microbiol. 2005 May; 43(5): 2350-2355.
- (7) Kubota K, Barrett TJ, Ackers ML, Brachman PS, Mintz ED. Analysis of *Salmonella* enterica Serotype Typhi Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns Associated with International Travel. J Clin Microbiol. 2005 Mar; 43(3): 1205-1209.
- (8) Gowan JBM. Infection Control Epidemiology and Clinical Microbiology, in Manual of Clinical Microbiology, Murphy P., Editor. Washington DC; 1995. p. 182-9.
- (9) Popoff MYL. Le Minor. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars, 6ta edición. WHO Collaborating center for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute, Paris, France; 1992.
- (10) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006 (antes NCCLS), vol. 26 N° 3. Performans Standars for Antimicrobial Testing; Table 2J, Vol. 26, N° 1 January 2006.
- (11) Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogen by pulsed-field gel electrophoresis: training manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- (12) Applied Maths BVBA. 2005. BioNumerics version 4.0 manual. Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium.
- (13) Hunter S, Vauterin P, Lambert-Fair M, Van Duynne M, Kubota K, Graves L, Wrigley D. et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. J Clin Microbiol. 2005 March; 43(3): 1045-1050.
- (14) Miró A, Ríos de Selgrad M. Calidad microbiológica de los quesos blancos venezolanos, analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Período enero 1988 a junio 1998. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Vol. XXX; 1999.

Recibido: 20 de enero de 2010 / Aprobado: 10 de septiembre de 2010