

ANLIS - 'DR. CARLOS G. MALBRAN'
INSTITUTO NACIONAL DE PRODUCCION DE BIOLOGICOS
DEPARTAMENTO DE REACTIVOS DE DIAGNOSTICO
SERVICIO ANTIGENOS Y ANTISUEROS

**Tipificación molecular de *Salmonella* por PCR-RLBH en
base a genes codificantes para antígenos flagelares**

**Tesis de Maestría en Microbiología Molecular de la Universidad Nacional
de General San Martín**

Autor: Lic. Ariel Rogé

Director: Dr. Martín José Zumárraga

CIUDAD AUTONOMA DE BUENOS AIRES

2012

SINTESIS

Los aislamientos de *Salmonella* se han clasificado tradicionalmente por serotipificación, la identificación serológica de dos antígenos de superficie, el polisacárido “O” y la proteína flagelar. La serotipificación ha sido de gran ayuda para la investigación de brotes y entender la epidemiología de *Salmonella*. Sin embargo, la producción y el control de los antisueros necesarios para llevar a cabo la misma, requiere de una tarea laboriosa con un gran consumo de tiempo y recurso humano. Con el objeto de disminuir los problemas asociados a la producción de antisueros, nos propusimos desarrollar y evaluar un método de identificación molecular basado en la combinación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, sigla en inglés) con la hibridación en línea reversa (RLBH, sigla en inglés) para la determinación de serovariedades de *Salmonella*. Dada la gran variedad de antígenos reconocidos, el estudio estuvo delimitado al gen *fljB*, que codifica para el antígeno de la segunda fase flagelar utilizándose 4 sondas de captura para los antígenos del complejo H1. Se estudiaron 81 cepas de referencia de *Salmonella* que poseen este tipo de antígenos. Se obtuvo una hibridación específica entre todos los productos amplificados con sus respectivas sondas, salvo para el caso de cuatro serovariedades con antígeno H:1,5; donde posteriormente se comprobó la presencia de polimorfismo en el sitio de unión. Los resultados estuvieron disponibles en 12 horas aproximadamente. El método demostró ser específico y reproducible e independiente de la fase expresada por la bacteria en el momento del ensayo. De esta forma, consideramos a la PCR-RLBH como una herramienta novedosa para la determinación de serovariedades de *Salmonella*.

A Pao, Marto y Facu

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que en alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo.

Al Dr. Martín Zumárraga, director de esta Tesis, por su apoyo y dedicación; así como por sus sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM) y la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) que me ha permitido la realización de esta Maestría. A sus organizadores y profesores, especialmente a la Dra. Mirta Carlomagno por su constante apoyo y estímulo.

A la Bioq. Beatriz López por su predisposición permanente en aclarar mis dudas y por sus enseñanzas acerca de la Técnica de Hibridación Reversa.

Al Dr. Alejandro Reyes por su participación en el análisis de las secuencias y diseño de los oligonucleótidos.

Al Instituto de Biotecnología (CICVyA, INTA, Castelar) por permitirme trabajar en sus laboratorios y por el trato que he recibido durante mi estadía.

A mis compañeros del Servicio Antígenos y Antisueros les agradezco el apoyo, la cooperación y especialmente y sobre todo, el cariño y amistad.

A todos ellos, muchas gracias por todo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
I.1. Introducción	1
I.2. Situación actual de la salmonelosis	2
I.3. Taxonomía y nomenclatura del género <i>Salmonella</i>	5
I.4. Características generales y bioquímicas	6
I.5. Estructura antigénica	8
I.5.1. Antígeno somático “O”	8
I.5.2. Antígeno flagelar “H”	10
I.6. Mecanismo de variación de fase flagelar	12
I.7. Métodos de tipificación	13
I.7.1. Métodos fenotípicos	14
I.7.2. Métodos genotípicos	15
I.8. Principio de PCR-RLBH	18
I.9. Hipótesis	21
I.10. Objetivos	22
II. MATERIALES Y METODOS	23
II.1. Serotipificación	23
II.2. Diseño de sondas y cebadores	26
II.3. Desarrollo de PCR-RLBH	28
II.4. Detección de la hibridación	31
II.5. Secuenciación	33
III. RESULTADOS	34
III.1. Análisis de las secuencias para el diseño de las sondas de captura	34
III.2. Detección de la región amplificada del gen <i>fljB</i>	36
III.3. Determinación de las condiciones óptimas de hibridación	37
III.3.1. Evaluación de distintas temperaturas	37
III.3.2. Determinación del tiempo de exposición	39

III.3.3. Evaluación de las distintas concentraciones de sondas	39
III.4. Evaluación de PCR-RLBH	40
III.5. Reutilización de la membrana	44
III.6. Secuenciación de las muestras negativas por PCR-RLBH	45
IV. DISCUSION	47
V. CONCLUSIONES	54
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
EDAC: N-3-dimetilaminopropil-N'etilcarbodiimida clorhidrato
EDTA: Sal disódica del ácido etilén diamino tetraacético
ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos
RLBH: Hibridación reversa en línea
KW: Kauffmann-White
LPS: Lipopolisacárido
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONPG: Orto-nitro-fenil- β -D-galactopiranosido
pb: Pares de bases
PFGE: Electroforesis en gel en campos pulsados
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP: Polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SFF: Solución fisiológica formolada
SSPE: Solución salina Fosfato-EDTA
TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA
Tm: Temperatura de hibridación
Tris-HCl: Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato
TSA: Agar tripticasa soya
TSB: Caldo tripticasa soya
UV: Ultravioleta

I. INTRODUCCION

I.1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) y otras infecciosas entéricas son una causa importante de morbilidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de dos millones de personas mueren cada año a causa de estas patologías (WHO, 2005).

En Argentina, la gastroenteritis aguda es una de las afecciones más comunes (Boletín Epidemiológico Periódico del Ministerio de Salud, 2006). La severidad de la enfermedad puede variar desde una simple diarrea hasta complicarse con cuadros de deshidratación que conducen a la hospitalización e incluso la muerte. El género *Salmonella* es una de las principales causas de gastroenteritis humana en el mundo (Herrera-León *et al.*, 2004) y se debe al consumo de alimentos contaminados desde su origen o por falta de higiene durante su manipulación (Herikstad *et al.*, 2002; Ríos *et al.*, 2009). La ingestión de alimentos contaminados se encuentra involucrada en la mayoría de los casos de salmonelosis humana (>95%). También puede dar lugar a la infección el contacto directo con animales domésticos portadores, el contacto persona-persona y la transmisión nosocomial (Crum-Cianflone, 2008).

La clasificación tradicional de *Salmonella* se basa en la identificación inmunológica del lipopolisacárido localizado en la pared celular (antígeno somático "O"), de la proteína flagelar de fase 1 (H1) y de la proteína flagelar de fase 2 (H2). La complejidad del esquema de serotipificación requiere la producción y el mantenimiento de alrededor de 250 tipos de antisueros distintos para poder identificar todas las serovariedades. Por otro lado, pueden existir dificultades con la expresión de algún antígeno como en el caso de cepas rugosas, donde no se manifiesta correctamente el antígeno "O"; así como también en las

cepas inmóviles que no expresan el antígeno flagelar (Ewing, 1986). Para evitar dichos problemas, se han desarrollado distintos tipos de métodos moleculares basados en los genes que codifican para los antígenos asociados a la serotipificación tradicional (Echeita *et al.*, 2002; Herrera-León *et al.*, 2004; Luk *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2009; Fitzgerald *et al.*, 2007; Dauga *et al.*, 1998).

I.2. Situación actual de la salmonelosis

El mayor número de casos de *Salmonella entérica* suele asociarse a la temporada estival, donde existe una mejor multiplicación del microorganismo en los alimentos sumado a posibles fallas en la cadena de frío. Los números de los casos de salmonelosis declarados en diferentes países, son muy variados y generalmente no se corresponden con el número real (Crum-Cianflone, 2008). Esto es, en gran medida, debido a la mayor o menor atención que se dedica a la vigilancia epidemiológica. La vigilancia epidemiológica de *Salmonella*, se ha establecido como método para monitorear la incidencia de la infección en el hombre y los animales, además de ser una herramienta importante para evaluar el impacto de los programas de inocuidad de alimentos y medio ambiente. El objetivo de esta vigilancia es permitir el establecimiento de medidas de control apropiadas cuando se identifican problemas o peligros relacionados con la salud animal o pública (Flint *et al.*, 2005). Paradójicamente, los países con mejores condiciones sanitarias declaran mayor número de casos de salmonelosis, que aquellos con medidas más deficitarias; esto se debe fundamentalmente, a las diferencias en la información epidemiológica suministrada y en los controles sanitarios existentes (Herikstad *et al.*, 2002).

La sub-notificación sanitaria, reconocida por los propios organismos encargados de realizar las estadísticas, conducen a que en Latinoamérica y el Caribe no se tenga una estimación sobre el impacto de esta bacteria en la salud, ni su

verdadera contribución a la contaminación de los alimentos. La propia OMS estima que América Latina y el Caribe tienen un nivel de notificación de casos que no supera el 30% de la casuística real (WHO, 2007; Tauxer, 1997).

El conocimiento de la epidemiología de la salmonelosis constituye la principal herramienta para el control sanitario de esta enfermedad. El estudio de un brote endémico o epidémico de etiología bacteriana tiene por objeto determinar si se trata de una situación producida por una misma cepa o diferentes cepas de una misma especie. Por otra parte, es necesario estudiar la identidad entre cepas aisladas de los enfermos y del sitio sospechado como foco de contaminación. La serotipificación es la técnica que ha sido empleada tradicionalmente para la identificación de *Salmonella* y por su amplia utilización permite conocer las variaciones en la incidencia de las principales serovariedades, facilitando enormemente los conocimientos sobre epidemiología y la investigación de brotes. Las actividades en la vigilancia de *Salmonella*, dependen de la exactitud en la determinación de la serovariedad (Fitzgerald *et al.*, 2007).

En Argentina, los únicos datos disponibles de ETA, son los proporcionados en los “Boletines Epidemiológicos del Ministerio de Salud de la Nación”. De acuerdo a informes del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) dependiente del Ministerio de Salud de la Nación, se producen, en promedio por año, más de 400 mil diarreas en niños menores de 5 años de edad, e igual cifra en mayores de esa edad. Si bien no se especifican las causas o el agente etiológico, la OMS estima que el 70% de las diarreas son provocadas por el consumo de alimentos o agua contaminados (Pérez *et al.*, 2003). Por ende, en Argentina más de 280 mil diarreas en ambas franjas de edad son a causa de ETA. En el Boletín Epidemiológico Nacional, publicado en el año 2003, se informó que en el 73,4% de los brotes pudo identificarse al agente causal, siendo el 55,3% *Salmonella* sp y *Escherichia coli* sp (Michelena, 2008). Como se puede observar en la tabla 1, a

través de los años no se ha logrado disminuir la prevalencia de diarreas ni atenuar la presencia de patógenos como *Salmonella*.

Tabla 1: Enfermedades de transmisión digestiva de declaración obligatoria.

Enfermedad	Año				
	2002	2003	2004	2005	2006
Diarreas < de 5 años de edad	516.600	476.863	478.633	480.525	439.210
Diarreas > de 5 años de edad	407.140	414.556	497.458	475.447	455.980
Diarreas sin especificar edad	10.546	8.687	8.465	31.834	14.017
Hepatitis A sin especificar edad	19.359	48.470	61.289	22.773	10.075
Botulismo	17	15	17	5	6
Fiebre tifoidea y paratifoidea	134	128	78	99	92
Intoxicación alimentaria	3.839	3.794	3.936	6.029	6.046
Marea roja	22	0	0	1	2
Síndrome urémico hemolítico	400	183	192	180	268
Triquinosis	977	929	754	391	1127
Cólera	0	0	0	0	0

(Fuente: Boletín Semanal de Notificaciones 2002/2006).

Por otro lado, según los datos aportados por el Sistema de Vigilancia de Laboratorio (SIVILA), en el año 2011 se estudiaron 18219 muestras provenientes de pacientes con diarreas, pudiéndose identificar el agente bacteriano en 4967 de las mismas. Como se puede observar en la tabla 2, un 10% de dichos aislamientos correspondieron a *Salmonella*.

Tabla 2: Distribución de enteropatógenos bacterianos (n=4967) aislados en el 2011.

Microorganismo	Serotipificación tradicional	
	Total Positivos	Porcentaje
<i>Campylobacter</i>	792	16%
<i>E. coli</i>	889	18%
<i>Salmonella</i>	508	10%
<i>Shigella</i>	2758	55%
Otros	20	1%

(Fuente: SIVILA, Notificación Agrupada - Listado Condensado Año: 2011, Grupo: Diarreas Bacterianas, Total Pacientes: 18219).

I.3. Taxonomía y nomenclatura del género *Salmonella*

La clasificación de las salmonelas ha sido objeto de controversia durante muchos años. De acuerdo con la actual nomenclatura, el género *Salmonella* incluye solo dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Grimont y Weill, 2007; Reeves *et al.*, 1989). *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, que se distinguen por algunas características bioquímicas y se designan por números romanos o nombres. Estas subespecies son:

<i>Subespecies de Salmonella enterica</i>	
I	<i>Enterica</i>
II	<i>Salamae</i>
IIIa	<i>Arizonae</i>
IIIb	<i>Diarizonae</i>
IV	<i>Houtenae</i>
VI	<i>Indica</i>

S. bongori fue originalmente designada *S. enterica* subesp. V, pero luego se demostró que se trataba de una especie distinta de *Salmonella*. Sin embargo, para simplificar y evitar confusiones, la designación de la serovariedad se refiere comúnmente como ‘subespecie V’.

Las cepas de *Salmonella* se clasifican en serovariedades según la gran diversidad de los antígenos “O” del lipopolisacárido (LPS) y de los antígenos proteicos de los flagelos “H” acorde a la clasificación de Kauffmann–White. Con el fin de agilizar la transcripción de las serovariedades, Le Minor y Popoff, (1987), propusieron referirse a la serovariedad escribiendo en letra no cursiva e iniciando con letra mayúscula. De este modo, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad Typhimurium se convierte en *Salmonella* serovariedad Typhimurium o simplemente *Salmonella* Typhimurium. Los serotipos pertenecientes a las otras

subespecies son designados por su fórmula antigénica (Grimont y Weill, 2007; Brenner *et al.*, 2000).

I.4. Características generales y bioquímicas

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está compuesto por bacilos Gram negativos, no esporulados, no capsulados (salvo *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin*), normalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*) aerobios o anaerobios facultativos. *S. Typhi* que no produce gas y *S. Paratyphi A* que no produce H₂S (Ewing, 1986), constituyen excepciones dentro de este género. Se multiplica a temperaturas que van de 7°C a 45°C y puede sobrevivir durante meses en sustratos orgánicos. La inactivación se produce a pH por debajo de 5 y a temperaturas superiores a los 60°C. Los desinfectantes comunes, ya sea basados en principios fenólicos, clorados ó iodados son eficaces frente a *Salmonella*.

Las pruebas bioquímicas que se utilizan para identificar presuntivamente a los aislamientos de *Salmonella* son la catalasa (positiva), la oxidasa (negativa), la fermentación de la glucosa y otros carbohidratos, con la producción usualmente de gas, la producción de ácido sulfhídrico, la actividad lisina decarboxilasa, la capacidad de crecimiento en agar citrato de Simmons, la no producción de indol y la incapacidad de hidrolizar urea (Tabla 3).

Algunas características de *Salmonella* se utilizan para su aislamiento selectivo; destacándose la resistencia a algunos colorantes como el verde brillante o verde malaquita y la resistencia al tetrationato o al selenito.

Tabla 3: Caracteres bioquímicos del género *Salmonella*.

Prueba	Resultado
Indol	1
Rojo de metilo	100
Voges-Proskauer	0
Citrato (Simmons)	95
H ₂ S	95
Urea	1
Fenilalanina deaminasa	0
Lisina decarboxilasa	98
Arginina decarboxilasa	70
Ornitina decarboxilasa	97
Movilidad (36°C)	95
Gelatinasa	0
Glucosa	96
Lactosa	1
Sacarosa	1
Manitol	100
Dulcitol	96
Adonitol	0
Sorbitol	95
Arabinosa	99
Rafinosa	2
Ramnosa	95
Xilosa	97
Melibiosa	95
ADNasa, 25°C	2
ONPG	2

(Tomado de Farmer *et al.*, 1985).

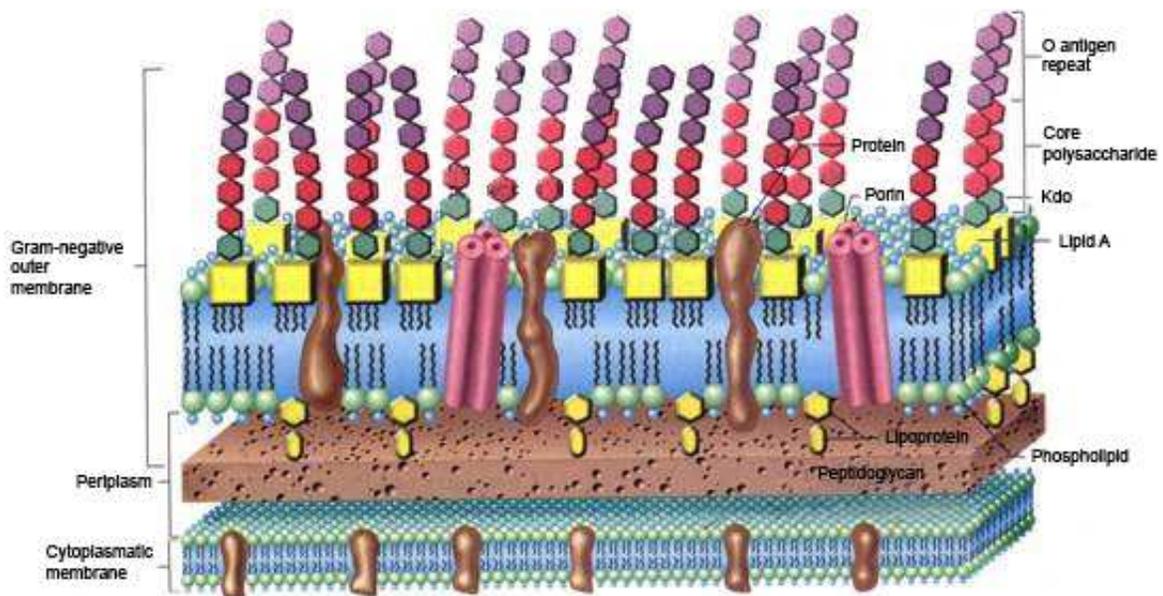
I.5. Estructura antigénica

El género *Salmonella* posee dos clases de antígenos utilizados como marcadores epidemiológicos que dan lugar a las distintas serovariedades. Estos son, los antígenos somáticos “O” y los antígenos flagelares “H” (Grimont *et al.*, 2007; Brenner *et al.*, 2000).

I.5.1. Antígeno somático “O”

El antígeno somático “O” es el polisacárido presente en la zona exterior del LPS que se encuentra anclado en la membrana externa del microorganismo y determina la especificidad serológica de cada LPS, constituyendo la base clasificatoria de *Salmonella* (Figura 1).

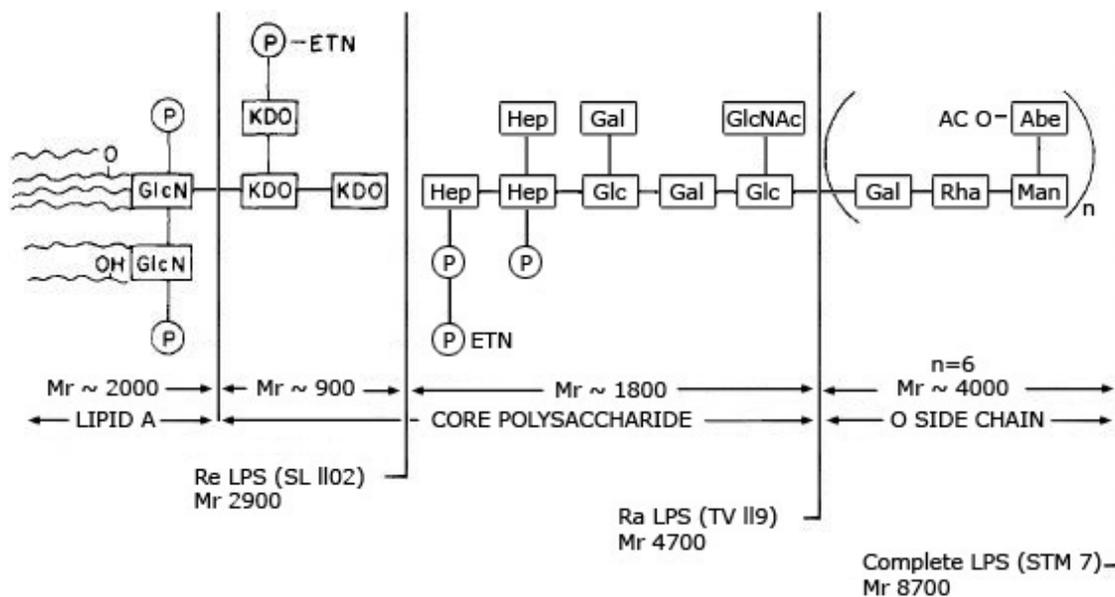
Figura 1: Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram negativas.



(Tomado de Brock, 2000).

El polisacárido está formado por unidades repetitivas llamadas subunidades “O”, compuestas de cuatro a seis azúcares dependiendo del antígeno “O” (Figura 2). Los diferentes antígenos “O” resultan de variaciones en los componentes sacarídicos de la subunidad “O” y de la variación en el tipo de enlace covalente entre los azúcares de la subunidad (Verma *et al.*, 1988).

Figura 2: Estructura química del LPS de *S. Typhimurium*.



GlcNAc, N-acetylglucosamine; P, phosphate; KDO, 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid; P-ETN, phosphorylethanolamine; HEP, heptose; GLC, glucose; GAL, galactose; RHA, rhamnose; MAN, mannose; ABE, abequose; O-AC, O-acetyl. Wavy lines, fatty acids.

(Tomado de Shands *et al.*, 1980)

La presencia del antígeno somático se detecta por técnicas de aglutinación en tubo, portaobjetos o microaglutinación, visualizándose como una aglutinación granular, fina, lenta y difícil de disociar por agitación (Ewing, 1986). Dentro del género *Salmonella*, se conocen 67 determinantes antigénicos “O” distintos, designados por números. Se los puede clasificar en factores antigénicos mayores o de grupo, que definen los serogrupos conocidos, y factores antigénicos menores que

suelen ir asociados a uno o varios factores antigénicos mayores. Esto ha permitido dividir a las serovariedades de *Salmonella* en 46 grupos, donde los organismos aislados más frecuentemente en humanos están incluidos dentro de los primeros seis grupos. Los miembros de cada grupo O se diferencian en serovariedades, basándose en determinaciones adicionales de los factores antigénicos menores y en los antígenos flagelares (Popoff, 2001).

I.5.2. Antígeno flagelar “H”

Una de las características principales de *Salmonella*, cuando se observan cepas a través de un microscopio electrónico, es un sistema de apéndices muy finos y helicoidales que le sirven de movilidad. Generalmente se denominan flagelos, aunque estrictamente, son la porción externa del flagelo. Más específicamente son filamentos flagelares y es donde se encuentra la diversidad antigénica que se pone de manifiesto en la serotipificación. Estos filamentos tienen alrededor de 10 μm de longitud y están formados por alrededor de 20.000 subunidades de proteína llamada flagelina, cuyo peso molecular varía entre 51.000 y 57.000 KDa (Li *et al.*, 1994; Joys, 1985).

En la práctica, la detección de los antígenos flagelares se hace por aglutinación en portaobjetos o tubo a partir de una suspensión de gérmenes móviles. La aglutinación es reversible y tiene un aspecto flocular (Lindberg *et al.*, 1984).

Los antígenos “H” de *Salmonella* se denominan por letras del alfabeto (desde la “a” hasta la “z”) y por números arábigos. Las limitaciones del alfabeto hicieron que sea necesario usar números como subíndices (z_1 , z_2 , etc.) para designar los antígenos caracterizados luego del z. Estos antígenos no son subdivisiones del z, por el contrario, son una entidad separada e incluso hasta más relacionada con otros antígenos “H” (Ewing, 1986).

La mayoría de las serovariedades expresa dos formas flagelares distintas denominadas fase 1 (proteína flagelar FliC) y fase 2 (proteína flagelar FljB) (Silverman *et al.*, 1979). Existe una coordinación para que se exprese solamente un antígeno a la vez por cada célula bacteriana (Bonifield *et al.*, 2003). Las proteínas flagelinas FliC y FljB son idénticas en los primeros 71 aminoácidos y los últimos 46 aminoácidos, pero los aminoácidos que están expuestos en el medio son distintos, resultando en diferentes antigenicidades. Los aislamientos monofásicos son aquellos que expresan solamente un tipo de flagelo. Esto ocurre naturalmente para algunas serovariedades (ej., *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, y la mayoría de las serovariedades de la subespecies IIIa y IV), o puede ocurrir por la inactivación del gen que codifica para el antígeno de la fase 1 o la fase 2.

Para la fase 1 se han descrito 63 antígenos distintos mientras que para la fase 2, 37. Algunos de estos antígenos están definidos por un factor solo (ej. antígenos i, d ó r) mientras que otros se encuentran formados por varios factores (ej. el antígeno e,n,x está formado por tres determinantes antigénicos: e, n, y x que aparecen juntos en un antígeno). Los antígenos flagelares que están relacionados inmunológicamente se conocen con el nombre de complejos; por ejemplo, el complejo HG incluye todos los tipos que contienen el factor antigénico g (ej. g,m; f,g; g,p) más el antígeno m,t. Los tipos antigénicos flagelares que incluyen el determinante antigénico 1 (ej. 1,2; 1,5; 1,6; 1,7) son considerados como complejo H1 (McQuiston *et al.*, 2004).

Los genes secuenciados que codifican para las proteínas flagelares tienen entre 1488 a 1536 nucleótidos de longitud, excepto las secuencias de los antígenos del complejo Z4 y sus antígenos relacionados que tienen entre 1266 a 1280 nucleótidos. Todas las secuencias se encuentran muy conservadas en sus extremos 5' y 3' mientras que la región central es variable. Las regiones conservadas forman la estructura del filamento flagelar y son críticas para el ensamble del mismo. La

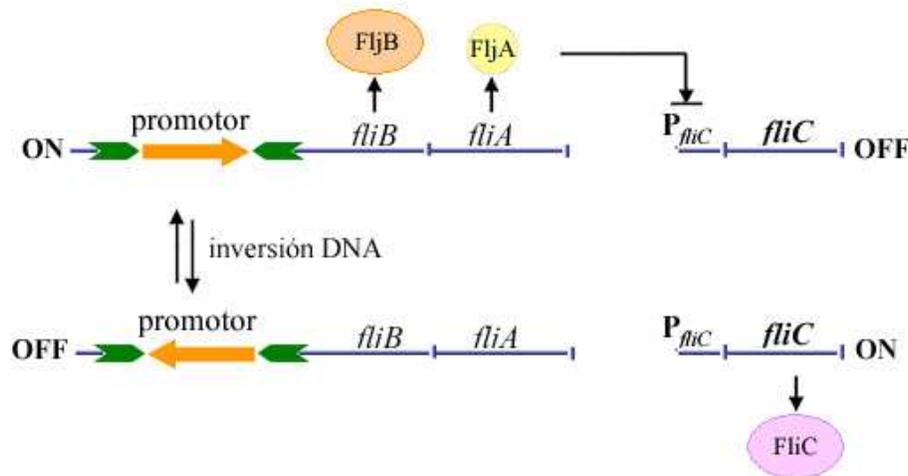
región central, correspondiente a los aminoácidos 181 a 390, codifican la superficie expuesta y la porción antigénicamente variable (Bonifield *et al.*, 2003).

I.6. Mecanismo de variación de fase flagelar

Por un proceso llamado variación de fase, *Salmonella* expresa en forma alternada los dos filamentos de proteína flagelar distintos, FljB y FliC. Los mecanismos moleculares que intervienen en la variación de fase flagelar, ocurren por un suceso de inversión en un sitio específico del ADN en el cromosoma (Figura 3). El promotor para la proteína flagelar FljB está flanqueado por los sitios de recombinación *hixL* y *hixR*. La recombinasa *Hin*, junto con las proteínas FIS (factor para la estimulación de la inversión) y HU, median una reacción de recombinación reversible entre los sitios *hix*, resultando en la inversión del segmento de ADN que contiene el promotor *fljBA*. En una orientación, el promotor *fljBA* dirige la transcripción del operón *fljBA* y se produce la flagelina FljB. El gen *fljA* es cotranscripto con *fljB* y codifica para un inhibidor transcripcional del gen *fliC*. En la orientación alternativa, el operón *fljBA* no se expresa y entonces ocurre la transcripción del gen *fliC* (1) (Bonifield *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 1979).

S. enterica alterna la expresión de estas proteínas en un rango de 10^{-3} a 10^{-5} por generación celular. De hecho la mayoría de las fases de *Salmonella* varían, en grado similar, entre la expresión de los 2 diferentes genes de flagelina. Aunque la variación de fase flagelar haya sido postulada como un mecanismo por el cual la bacteria evita temporalmente la inmunidad celular, todavía se desconoce su papel en la patogénesis de *S. enterica* (Bonifield *et al.*, 2003).

Figura 3: Representación esquemática de la variación de fase flagelar en *S. enterica*.



(Tomado de Bonifield *et al.*, 2003)

I.7. Métodos de tipificación

Los métodos de tipificación son fundamentales para el entendimiento de la epidemiología y el monitoreo de brotes causados por *Salmonella*. Los sistemas de tipificación están basados en que los aislamientos relacionados clonalmente comparten algunas características, por lo tanto, pueden ser diferenciados de los aislamientos divergentes. La utilidad de una característica particular de tipificación está relacionada con su estabilidad dentro de una cepa y su diversidad dentro de la especie (Tenover *et al.*, 1995).

Los marcadores epidemiológicos se clasifican en fenotípicos, que están basados en la presencia o ausencia de características biológicas o metabólicas expresadas por los organismos (biotipo, antibiograma, serovariedades y fagotipos) (Anderson *et al.*, 1978; Anderson, 1968; Wassermann *et al.*, 1955) y genotípicos, basados directamente en el estudio del contenido de los ácidos nucleicos del microorganismo para la identificación de un clon, mediante el análisis de los elementos genéticos cromosómicos y extracromosómicos (Tenover *et al.*, 1995).

I.7.1. Métodos fenotípicos

Biotipado: Se basa en las diferencias metabólicas y/o propiedades fisiológicas. Ejemplo de ello son los diferentes patrones de fermentación que presentan determinadas cepas de una misma serovariedad frente a ciertos azúcares o alcoholes; y la habilidad para crecer a un pH o temperatura extremos (Anderson *et al.*, 1978).

Antibiograma: Este método utiliza los patrones de sensibilidad o resistencia que presentan las cepas frente a distintos antimicrobianos, pudiendo establecer diferencias dentro de una misma serovariedad. La resistencia a los antimicrobianos puede ser de gran utilidad como marcador epidemiológico complementario, sobre todo en los casos en que los marcadores epidemiológicos tradicionales no aporten suficiente discriminación (Anderson, 1968).

Serotipificación: Consiste, como ya se ha mencionado anteriormente, en la clasificación inmunológica de dos estructuras superficiales, el polisacárido O (antígeno “O”) y la proteína flagelar (antígeno “H”). Es la técnica que tradicionalmente se utiliza en el estudio de *Salmonella*, dado que en ella confluyen las propiedades de un marcador epidemiológico: buena sensibilidad, estabilidad, reproducibilidad y alto poder discriminatorio. El esquema de serotipificación de Kauffmann-White para la designación de serovariedades de *Salmonella*, reconoce 46 serogrupos “O” y 114 antígenos “H”, que combinados resultan en más de 2.500 serovariedades caracterizadas (Ewing, 1986; Grimont *et al.*, 2007).

Fagotipado: La fagotipia es un sistema de marcación basado en la tipificación de cepas por medio de bacteriófagos (Gershman, 1977). La utilización de la fagotipificación para propósitos epidemiológicos se fundamenta en asumir que

los aislamientos que pertenecen al mismo fagotipo tienen relación epidemiológica entre sí, mientras que los aislamientos de diferente fagotipo carecen de esa relación. Se han establecido internacionalmente esquemas de fagotipia para determinadas serovariedades de *Salmonella*, tales como Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B y Typhimurium (Wassermann *et al.*, 1955; Gershman *et al.*, 1983; Baggesen *et al.*, 1997).

I.7.2. Métodos genotípicos

La disponibilidad de nuevas técnicas de Biología Molecular así como el conocimiento de las secuencias genéticas, han permitido el desarrollo de diferentes métodos genotípicos para la subtipificación rápida de *Salmonella*. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de tipificación de la cepa a nivel genómico, de allí su poder como herramienta epidemiológica.

Análisis de plásmidos: El análisis del ADN plasmídico es la base de la mayoría de los estudios epidemiológicos moleculares (Mayer, 1988). En la mayoría de los microorganismos, un gran número de características fenotípicas están relacionadas con la presencia de plásmidos como ser el metabolismo de hidratos de carbono simples, producción de bacteriocinas, síntesis de enzimas intra o extracelulares, la resistencia a determinados antibióticos o la producción de toxinas. Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico bicatenario circular dotados de replicación autónoma, es decir que no son necesarios para el crecimiento normal de la bacteria. Estos pueden tener distintos tamaños y pueden aparecer en número variable. La técnica de perfil plasmídico se basa en que los aislamientos de una misma cepa contienen el mismo número y tamaño de plásmidos y con el mismo patrón de restricción. Además, son fenotípicamente similares, según su perfil antibiótico y su biotipo (Mayer, 1988).

Análisis con endonucleasa de restricción del ADN cromosómico: Se puede analizar el genoma bacteriano comparando los fragmentos obtenidos por la digestión con enzimas de restricción, sabiendo de antemano, que las cepas del mismo origen tienen el mismo genoma y, por lo tanto, el mismo número y posición de los sitios de reconocimiento de restricción. En el análisis con enzimas de restricción (REA, sigla en inglés), los fragmentos de ADN se comparan directamente, por medio de una electroforesis convencional en gel de agarosa. Una desventaja de esta técnica es que, dependiendo de la enzima de restricción usada, los resultados pueden ser difíciles de reproducir y de interpretar debido al gran número de fragmentos que con frecuencia se generan (Snipes *et al.*, 1989).

Polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, sigla en inglés): Consiste en transferir los fragmentos de restricción de ADN a membranas de nylon o nitrocelulosa (*Southern Blot*) y posterior hibridación con sondas de ADN específicas y marcadas, seguido de revelado por autorradiografía. Con este método se simplifica notablemente la lectura, interpretación y reproducibilidad, ya que se reduce considerablemente el número de bandas identificadas (aproximadamente entre 1 y 15). El polimorfismo está dado tanto por las variaciones en el número y tamaño de los fragmentos detectados, que reflejan las variaciones tanto del número de secuencias homólogas a la sonda, como a la localización de los sitios de restricción, que pueden encontrarse tanto en las secuencias que son homólogas a la sonda como en sitios próximos (Dauga *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 2002).

Ribotipificación: Esta técnica analiza el polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mediante la hibridación con ARN ribosomal. Una vez separados los fragmentos en el gel de agarosa por electroforesis, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa donde se hibridan con ARN ribosómico marcado (Snipes *et al.*, 1993). Este método ha sido empleado en la caracterización de serovariedades de *Salmonella* (Esteban *et al.*, 1993).

Electroforesis en campos pulsados (PFGE, sigla en inglés): En base a la propiedad de ciertas enzimas de restricción de tener pocos sitios de corte en el genoma bacteriano y producir menor cantidad de fragmentos, pero de mayor tamaño, se ha desarrollado para su separación la técnica de electroforesis en gel en campos pulsados. Esta técnica separa los fragmentos de ADN incluidos en un gel de agarosa, mediante la acción de campos eléctricos oscilantes aplicados a través de cuatro pares de electrodos distintos enfrentados entre sí. Esta técnica tiene limitaciones importantes debido que se requiere una obtención de ADN adecuada, necesitando períodos de incubación que van de 2 a 4 días. Otra limitación es que el equipamiento es relativamente caro y se requiere de un entrenamiento especializado (Sambrook *et al.*, 1989). Sin embargo, es considerado el método de referencia para subtipificación molecular de *Salmonella* (Thong *et al.*, 1995; Thong *et al.*, 1994).

La información epidemiológica, que proviene del análisis e interpretación de los patrones de los fragmentos de restricción, debe tener en cuenta los eventos de transformación genética al azar. Las mutaciones puntuales y las deleciones de ADN pueden alterar dichos patrones durante el curso de un brote por lo que se han asignado cuatro categorías de relaciones genéticas y epidemiológicas (Tenover *et al.*, 1995):

Aislamientos indistinguibles: Se denominan así cuando sus patrones de restricción tienen el mismo número y tamaño de bandas. Se considera que estos aislamientos pertenecerían a una misma cepa.

Aislamientos estrechamente relacionados: Se consideran de esta manera cuando sus patrones difieren en un solo un evento de transformación genética (mutación puntual, inserción o deleción de ADN). Se considera que estos aislamientos pertenecerían a una misma cepa.

Aislamientos posiblemente relacionados: Se consideran de esta forma cuando sus patrones difieren en dos eventos de transformación genética. Los

aislamientos se consideran posiblemente relacionados genéticamente pero no tienen relación a la cepa del brote.

Aislamientos no relacionados: Se designan aislamientos no relacionados cuando difieren en tres o más eventos de transformación genética independientes (generalmente siete o más bandas de diferencia) y se consideran no relacionados epidemiológicamente.

El método de tipificación ideal es aquel que tenga un poder discriminatorio igual a uno; es decir que dos aislamientos no relacionados epidemiológicamente, pueden ser diferenciados por la técnica utilizada en el 100% de los casos (Hunter y Gaston, 1988)

I.8. Principio de PCR-RLBH

El método consiste en amplificar por PCR una región polimórfica del genoma en estudio y detectar la presencia de secuencias de ADN específicas empleando la hibridación con sondas complementarias. Durante la fase de amplificación, como uno de los cebadores (*primers*) se encuentra marcado con biotina en su extremo 5'; el producto amplificado queda biotinilado. Posteriormente, se desnaturaliza e hibrida con sondas de oligonucleótidos fijadas en una membrana de nylon y dispuestas paralelas entre sí. La detección de la hibridación se realiza con un sistema de quimioluminiscencia. La peroxidasa del conjugado cataliza la reacción resultando una emisión de luz azulada que es detectada por la autoradiografía de la membrana con un filme sensible (Figura 4).

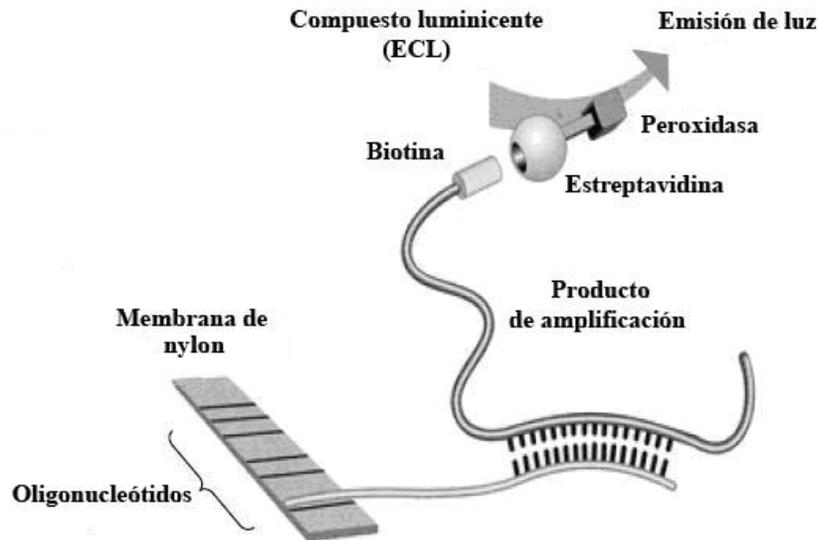
La sensibilidad y especificidad del método depende de las condiciones en que se lleven a cabo la PCR y la hibridación. Este sistema ha sido utilizado con éxito en la diferenciación interespecie e intraespecie de las micobacterias que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997), la identificación de genotipos de papillomavirus humano (van den Brule *et al.*, 2002), la

identificación de serovariedades de *Streptococcus pneumoniae* y antígenos proteicos de *Streptococcus agalactiae* (Kong *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006) y la detección de especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* (Playford *et al.*, 2006) entre otros.

La utilización de PCR-RLBH como método de tipificación flagelar de *Salmonella* desarrollado en el presente trabajo fue basado en el polimorfismo presente en la zona central de los genes que codifican para los antígenos flagelares. Los genes *fliC* y *fljB* codifican la proteína flagelar de fase-1 y fase-2, respectivamente y se ubican en dos regiones diferentes del cromosoma. La comparación de las secuencias de aminoácidos revela distintas regiones: mientras que las secuencias amino- y carboxi-terminal se encuentran conservadas, en la región central se observan las modificaciones responsables de la diversidad antigénica (Li *et al.*, 1994; Joys, 1985). Este tipo de secuencias polimórficas son las que comúnmente se utilizan en la técnica de PCR-RLBH para detectar los distintos polimorfismos dentro de una zona conservada (Kamerbeek *et al.*, 1997).

Dado que existe gran variabilidad entre los distintos antígenos flagelares de *Salmonella*, se buscó un grupo que tuviera una gran homología entre sí para evaluar el poder discriminatorio de la técnica de PCR-RLBH. Para ello se seleccionó el complejo H1 de la segunda fase flagelar formado por los antígenos H1,2, H1,5, H1,6 y H1,7; algunos de los cuales se diferencian entre sí por la variación de solo un nucleótido.

Figura 4: Esquema del proceso de hibridación reversa en línea.



(Tomado de Cockerill., 1999)

Considerando el papel primordial que juega la tipificación de *Salmonella* en la vigilancia epidemiológica y teniendo en cuenta los inconvenientes presentes en el sistema tradicional de serotipificación, es necesario contar con métodos alternativos basados en el esquema de Kauffmann-White que brinden resultados confiables. Por todo esto, mediante el presente estudio nos propusimos evaluar un método de tipificación molecular que permita identificar las secuencias de ADN que codifican para la síntesis de los antígenos flagelares de *Salmonella*.

I.9. Hipótesis

El ensayo de PCR-RLBH para la identificación de los genes que codifican para los antígenos flagelares de *Salmonella*, permite disponer de un método alternativo, para complementar o sustituir los métodos tradicionales de tipificación.

I.10. Objetivos

Objetivo general:

- Diseñar un método de tipificación molecular de *Salmonella* sp basado en el polimorfismo del gen *fljB*, que codifica para los antígenos flagelares del género, combinando una PCR con una posterior hibridación reversa en membrana.

Objetivos específicos:

1. Aplicar la amplificación por PCR del gen *fljB*, utilizando un único par de cebadores, para comprobar la capacidad de detección de las distintas serovariedades de la fase 2 de *Salmonella*.

2. Evaluar la hibridación con sondas de ADN específicas del gen que codifica para los antígenos flagelares del complejo H1 de *Salmonella*, como método de detección.

3. Comprobar la especificidad, reproducibilidad y poder discriminatorio del método, para la diferenciación de secuencias con una gran homología entre sí.

4. Detectar mediante secuenciación el polimorfismo dentro de los subfactores 2, 5, 6 y 7 del complejo H1.

II. MATERIALES Y METODOS

La investigación correspondiente a la amplificación por PCR del gen *fljB* fue realizada en el Servicio Antígenos y Antisueros, INPB, ANLIS. Para cumplir con el resto de los objetivos, las experiencias se realizaron en el Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, Castelar.

Cepas bacterianas: Las cepas de *Salmonella* utilizadas pertenecen a la colección del Servicio Antígenos y Antisueros, INPB, ANLIS. El panel estudiado incluyó 64 serovariedades distintas de *Salmonella*, abarcando los cuatro antígenos flagelares del complejo 1 de la fase 2 (Anexo 1).

Medios de cultivo y soluciones: La preparación y formulación de las distintas soluciones y medios de cultivo empleados se encuentran detalladas en el anexo 2 y 3 respectivamente.

II.1. Serotipificación

Todas las cepas fueron evaluadas con el método tradicional de serotipificación acorde al esquema de Kauffmann-White utilizando antisueros polivalentes, monovalentes y factores somáticos y flagelares producidos en el Servicio de Antígenos y Antisueros, INPB, ANLIS, a partir de un cultivo en TSA de 18 a 24 h de incubación, para determinar y confirmar las serovariedades respectivamente.

Detección de los antígenos somáticos: La reacción antígeno-anticuerpo para la caracterización del serogrupo O se llevó a cabo mediante la técnica de aglutinación en lámina a partir de cultivos de 24 h en TSA, incubados a 37°C. Previamente se verificó si la cepa se encontraba en forma lisa o rugosa, para lo cual se mezcló una ansada de la colonia con solución salina al 2% en una lámina de

vidrio (portaobjetos), rotando suavemente durante 1 min. Luego se observó cuidadosamente la presencia o ausencia de aglutinación, ya que la presencia de grumos confirma que la cepa se encuentra en su forma rugosa impidiendo realizar la serotipificación somática O. A las cepas que se encontraban en forma R se les realizó cultivos sucesivos en medios enriquecidos como agar sangre 5% para revertir la forma R a la forma S.

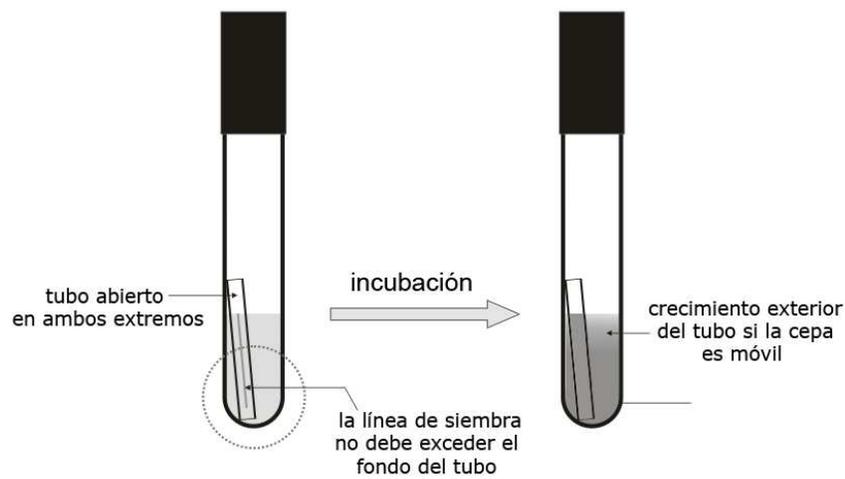
Una vez confirmada la lisura de la cepa, se preparó una suspensión con una turbidez similar a 20 veces el tubo 3 de la escala de McFarland en SSF al 0,5%. En una placa de vidrio se enfrentaron 20 μ L de dicha suspensión con 20 μ L del antisuero correspondiente, y luego la placa se rotó durante 1 min para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo. La interpretación de los resultados se realizó observando mediante una fuente de luz indirecta, la presencia o ausencia de aglutinación. La lectura de los resultados de las aglutinaciones somáticas se realizó de acuerdo al porcentaje de los microorganismos aglutinados (Anexo 4).

Detección de los antígenos flagelares: En la caracterización antigénica flagelar, mediante la técnica de aglutinación en tubo. Las cepas fueron sembradas a partir de un cultivo en TSA en 6 mL del medio Movilidad (Tubo de Craigie). La siembra fue realizada en el tubo interior, hasta la mitad del mismo. Al cabo de 18 a 24 h de incubación a 37°C, el inóculo progresó hasta el fondo a lo largo del tubo interior y luego salió hacia la superficie (Figura 5). Se tomó una ansada del crecimiento bacteriano observado en la superficie y se sembró en 5 mL de TSB incubado a 37°C por 24 h. Luego se le añadió 5 mL de SSF 1% y fue mezclado usando un vortex para obtener una suspensión bacteriana formolada homogénea. En tubos de ensayo de 13x100mm se colocó 1 mL de la suspensión bacteriana formolada y se agregaron 20 μ L del respectivo antisuero flagelar (H). Se incubó en baño de agua a 50°C durante 1 h y cuidando de no agitar los tubos después de la incubación a fin de no disgregar los flóculos, se observó la presencia o ausencia de floculación mediante una fuente de luz indirecta. La lectura de los resultados de las

aglutinaciones flagelares se realizó de acuerdo al porcentaje de los microorganismos aglutinados (Anexo 5). En aquellas cepas a las que inicialmente se les determinó una sola fase flagelar y que no expresan los antígenos flagelares de la otra fase, se realizó una inversión de fase.

Inversión de fase: Para poner en evidencia la fase ausente es necesario inmovilizar la fase detectada con un antisuero homólogo a la misma. Para esto se utilizó un tubo con 6 mL de medio para Craigie previamente fundido a 40°C, al cual se le adicionó 25 µL del antisuero flagelar correspondiente a la fase expresada, se homogenizó y se dejó solidificar. Luego se inoculó la cepa de *Salmonella* mediante un ansa de punción, dentro del tubo interior y se incubó a 37°C, durante 24 hs o hasta que se observara crecimiento en la parte externa del medio. Se transfirió el crecimiento de la parte externa del medio a TSB para la identificación de las fases flagelares mediante la técnica de aglutinación en tubo mencionada anteriormente. Las células que poseían la fase ya identificada quedaban inmovilizadas por el suero flagelar empleado, mientras las que tenían la fase no expresada conservaban su movilidad.

Figura 5: Modo de siembra para exaltación de la movilidad e inversión de fase (adaptación del tubo de Craigie).



II.2. Diseño de sondas y cebadores

Para la realización del ensayo se diseñaron las secuencias de los cebadores y de los oligonucleótidos de las sondas de captura, para su posterior síntesis.

Cebadores: Los cebadores se diseñaron teniendo en cuenta las distintas secuencias del gen *fljB* incluidas en el GenBank para las diferentes serovariedades de *Salmonella*. En el anexo 6, se muestran las fórmulas antigénicas y el número de acceso del GenBank de las secuencias utilizadas. El par de cebadores que hibridan en regiones conservadas del genoma de *Salmonella* spp., permitirá detectar, en la región amplificada, el polimorfismo que diferencian las distintas serovariedades.

Se buscó que el tamaño del fragmento amplificado no fuera mayor de 700 pb para permitir una buena hibridación con las sondas de captura (519 pb para los factores antigénicos del Grupo 1 y de 504 pb para e,n,x; e,n,z₁₅; l,w; y z₆). Los cebadores fueron diseñados considerando la similitud de sus temperaturas de hibridación (*T_m*, sigla en inglés) de aproximadamente 60°C, y con una longitud óptima de 20 bases en el programa Primer3 Input (primer3 www.cgi v 0.2). Uno de los cebadores fue marcado con biotina en el extremo 5' para permitir la detección de la hibridación mediante quimioluminiscencia (Tabla 4). En la siguiente tabla se muestran las secuencias y características de los cebadores.

Tabla 4: Cebadores usados para amplificar el gen *fljB*

Primer	Secuencia (5' - 3')	<i>T_m</i> (°C)	Marca	Dirección	Conc. (pmol)
HfIIIf	g aag cag atc aac tct cag acc	58,13	-	directo	50
HfIIbr	cc gcc ttc aat tgt ctt acc	59,57	biotina	reverso	50

Sondas de captura: Para el diseño de las sondas de captura se utilizó el programa para edición de alineamientos y análisis de secuencia Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999). La comparación de las secuencias de ADN y aminoácidos, del anexo 6, permitió identificar regiones que serían específicas para los diferentes antígenos flagelares. Como criterio para la construcción de las sondas de captura, se consideró que el tamaño de los oligonucleótidos fuera de 15 a 25 bases, con el mayor polimorfismo en el centro del mismo, y similitud tanto en las temperaturas de hibridación (T_m , sigla en inglés) como en las características termodinámicas de las posibles secuencias con el objeto de evitar la hibridación cruzada en otras zonas del genoma.

Para facilitar la unión covalente de las sondas al grupo carboxilo de la membrana Biodyne C (Biodyne C; Pall Bio-Support, East Hills, N.Y.), se les incorporó un grupo amino en el extremo 5' de las mismas. También se buscaron las condiciones óptimas de hibridación con respecto a la temperatura de hibridación (Tabla 5).

Tabla 5: Secuencias y características de las sondas de captura

Sonda	Blanco	Especificidad	T_m (°C)	GenBank nº acceso	Secuencia (5' - 3')
H1,2	<i>fljB</i>	Factor H 1,2	56,71	AY353268	640 GGT ACG AAT GGT ACG G655
H1,5	<i>fljB</i>	Factor H 1,5	59,3	AY353282	640 GGT ACG ACT GGT ACG G655
H1,6	<i>fljB</i>	Factor H 1,6	56,7	AY353295	635 TA GGT GGT ACG CTT GG650
H1,7	<i>fljB</i>	Factor H 1,7	56,7	AY353297	730 GGT GCT GAT CTC GAC A745

La especificidad de las secuencias, tanto de los cebadores como de las sondas, fue evaluada *in silico* utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para evitar la hibridación cruzada con otras regiones de alta homología.

II.3. Desarrollo de PCR-RLBH

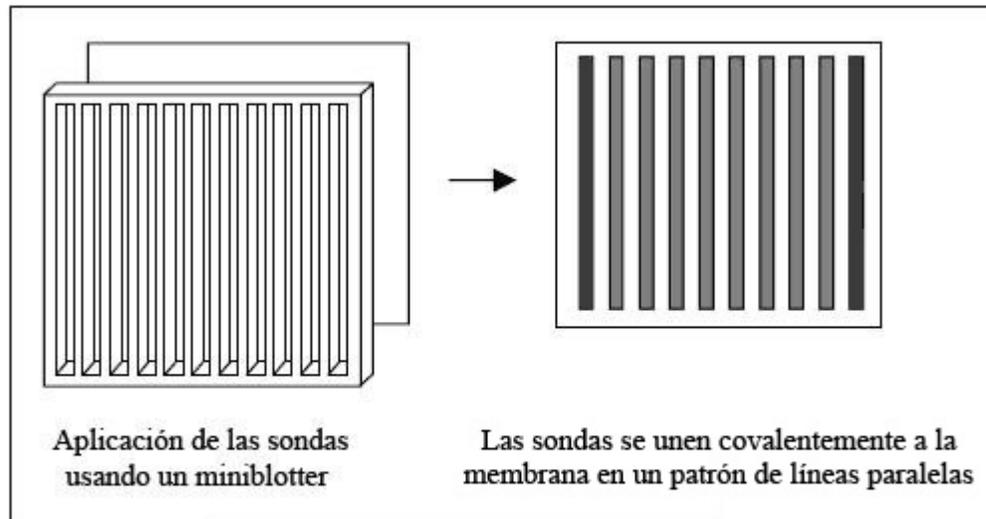
Preparación de la membrana: Se activó una membrana Boddyne C con EDAC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] (Sigma, St. Louis, Mo), al 16% durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. Cada oligonucleótido fue diluido para obtener un volumen final de 150 μ L de una solución 12,5; 25; 50; 100 y 200 pmol de sonda en NaHCO₃ 500 mM (pH 8,4). Las sondas se dispusieron de forma paralela entre sí mediante la ayuda de un miniblotteder MN45 (Ocimum Biosolutions Ltd, India), que consta de dos placas de acrílico, una inferior lisa y otra superior con 45 ranuras paralelas con orificios en los extremos por donde se siembran las muestras. Ambas placas se fijan entre sí mediante seis tornillos plásticos (Figura 6).

La fijación covalente de las sondas a la membrana se llevó a cabo durante 1 minuto a temperatura ambiente. Los extremos de la membrana fueron marcados con tinta estilográfica (Quick Parker) diluída 1/200 en agua.

Luego se inactivó la membrana con NaOH 100 mM durante 8 min en agitación. Finalmente se lavó con de SSPE 2x /0,1% SDS por 5 minutos a 60°C.

Extracción del ADN: Se recogió una colonia de *Salmonella* sp a partir de un cultivo de 18 horas a 37 °C en una placa con TSA. Esta biomasa fue resuspendida en 200 μ L de agua grado HPLC y fue calentada a 95°C durante 20 minutos y seguidamente fue centrifugada a 7.000 rpm durante 10 min. Diez microlitros del sobrenadante fueron usados como templado en la mezcla de PCR.

Figura 6: Disposición de las sondas en la membrana.



(Tomado de *Spoligotyping Manual*, ISOGEN LIFE SCIENCE)

Amplificación del fragmento del gen *fljB*: La mezcla de amplificación estuvo integrada por 50 pmol de cebadores (Operon, Cologne, Germany), buffer Tris-HCl (pH 8;0) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5mM, deoxinucleótidos trifosfato 200 μM, y 1U de Taq polimerasa por mezcla de reacción en un volumen final de 50 μL. (Todas las drogas empleadas, salvo los oligonucleótidos, fueron suministradas por Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción de amplificación se efectuó durante 40 ciclos bajo las condiciones que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6: Condiciones de amplificación

Etapas	Temperatura	Tiempo	Cantidad de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	/
Desnaturalización	94°C	30 segundos	} 40
Hibridación	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión Final	72°C	7 minutos	/

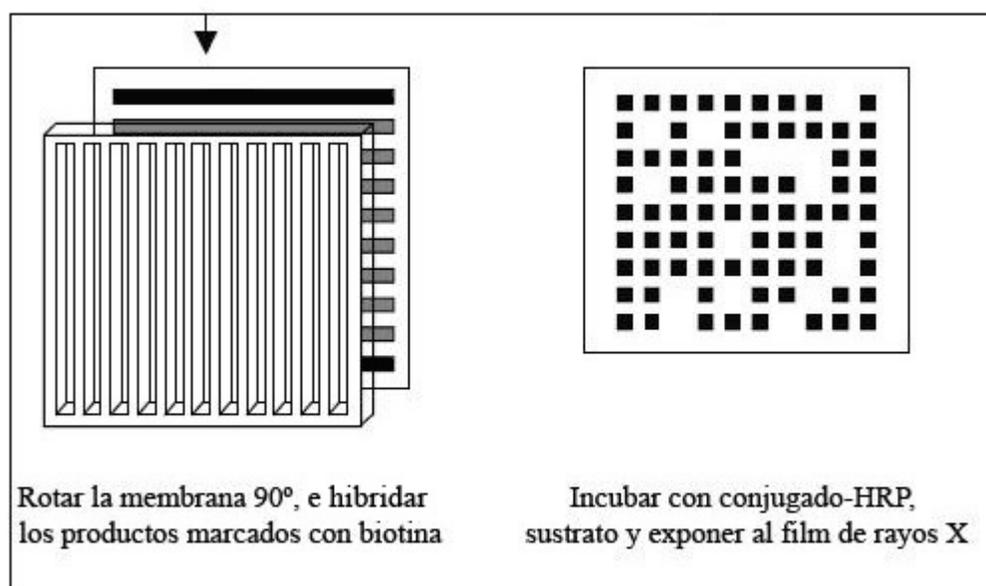
Detección de los productos de PCR: Diez microlitros de los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis horizontal en agarosa al 2%, durante 75 min a 90 voltios, con buffer TAE (Tris-Acetato 10mM, EDTA 1mM).

Para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular de ADN en el rango de 100 a 1000 pb (CienMarker; Biodynamics, Bs. As). El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y examinado con luz UV en un transiluminador (DNyA Light; Labnet, EUA) para visualizar las bandas. El registro fotográfico se realizó con el sistema de documentación digital DOC-6490 provisto de una cámara Kodak Z 712 IS (Biodynamics, Bs. As).

Determinación de las condiciones de hibridación: Se agregaron 20 µL de los productos de PCR biotinilados a 150 µl 2x de SSPE/0,1% SDS y luego de una desnaturalización por calentamiento a 94°C durante 10 minutos, rápidamente se colocaron en hielo. Los fragmentos amplificados se dispusieron de forma perpendicular, al sentido en que se fijaron previamente a la membrana de nylon los cuatro oligonucleótidos inmovilizados, con ayuda del *miniblotter* (Figura 7).

La hibridación se realizó a distintas temperaturas entre 45°C y 55°C para definir la temperatura óptima de hibridación. Esto se llevó a cabo en un horno de hibridación (Biometra OV5, Germany) durante 1,5 h.

Figura 7: Esquema de la distribución y detección de los productos amplificados.



(Tomado de *Spoligotyping Manual, ISOGEN BIOSOLUTIONS*)

II.4. Detección de la hibridación

Detección de las señales: Para verificar la presencia de hibridación, luego de dos lavados con SSPE 2x/0,5% SDS a 37°C, la membrana se incubó con el conjugado streptavidina-peroxidasa (Calbiochem, USA) por 60 min. a 42°C (diluido 1: 5000 en SSPE 2x/0.5% SDS), se lavó dos veces con SSPE 2x/0,5% SDS por 10 min a 42°C y 2 veces con SSPE 2x por 5 min. La detección se realizó por quimioluminiscencia mediante la incubación durante 1 minuto con ECL

(Amersham, GE Healthcare Limited, UK), según las especificaciones del fabricante, seguido de una exposición al filme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Limited, UK) a distintos intervalos de tiempo (Figura 8). El revelado del filme se realizó en cuarto oscuro con revelador y fijador radiográfico (Kodak, USA).

Lectura e interpretación: Se consideró que sólo ocurre una detección de la señal quimioluminiscente cuando se produce una perfecta hibridación entre el oligonucleótido inmovilizado y el producto de PCR marcado. La hibridación con alguno de los 4 oligonucleótidos de captura indicó la presencia de dicha zona polimórfica en el gen *fljB* y por tanto la muestra analizada fue asociada al antígeno flagelar correspondiente.

Figura 8: Esquema de la distribución de los diferentes oligonucleótidos en la membrana de nylon.

		CONTROLES			
		H 1,2	H 1,5	H 1,6	H 1,7
SONDAS	H 1,2	■	□	□	□
	H 1,5	□	■	□	□
	H 1,6	□	□	■	□
	H 1,7	□	□	□	■

Análisis de los resultados: Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y el índice de concordancia Kappa, para cada uno de los oligonucleótidos de captura. Los resultados fueron ingresados a las tablas de doble entrada tomando como referencia los resultados de la serotipificación (Anexo 7).

Reutilización de las membranas: Los productos de PCR hibridados fueron removidos de la membrana para permitir su reutilización en otra hibridación. Para esto, la membrana se lavó dos veces en 1% SDS a 80°C por 30 min. c/u seguido de una incubación en 20 mM EDTA (pH 8) a temperatura ambiente por 15 min. La membrana se selló con film plástico y se guardó a 4°C hasta su reutilización.

II.5. Secuenciación

Para verificar la presencia de polimorfismo en la región de unión a la sonda, de aquellas muestras que no hibridaron con su correspondiente oligonucleótido de captura, se secuenció el producto de amplificación. Se purificó la banda proveniente de un gel de agarosa con “illustra DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare, UK). La secuenciación se realizó en un secuenciados de 16 capilares ABI3130xl (Applied Biosystems), utilizado “Big Dye Terminator v3.1”(Cycle Sequencing Kit), en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, de INTA Castelar.

III. RESULTADOS

III.1. Análisis de las secuencias para el diseño de las sondas de captura

En la figura 9 se muestra el alineamiento de las secuencias de la región variable del gen *fljB* para las distintas serovariedades de *Salmonella* del anexo 6. Se observaron diferencias de nucleótidos entre las secuencias que codifican para cada antígeno en particular, así como para las que codifican para distintos antígenos.

Se pudieron identificar regiones específicas para diferenciar a cada antígeno flagelar. El conjunto de las secuencias presentaba alto grado de homología, por ejemplo, en la posición 167 la base nitrogenada adenina estaba solamente en las secuencias que codifican para el antígeno 1,2, la base citosina fue encontrada únicamente en las secuencias codificantes del antígeno 1,5 y la base nitrogenada timina en las secuencias que codifican para el antígeno 1,6. Estas diferencias puntuales permiten diferenciar las secuencias que codifican para los diferentes antígenos. Considerando la diferencia en la posición 167 antes mencionada y algunas otras pocas variaciones, se decidió usar la secuencia entre los nucleótidos 160 a 175 para las sondas H1,2 y H1,5, mientras que para la sonda H1,6 se decidió usar la secuencia entre los nucleótidos 155 a 170 debido a que en la posición 171 se observó un polimorfismo de citosina y timina entre las distintas serovariedades de *Salmonella* H1,6. Para la sonda H1,7 se eligió la región nucleotídica entre las posiciones 250 y 265 como óptima, con una diferencia entre 3 a 4 nucleótidos con los otros antígenos.

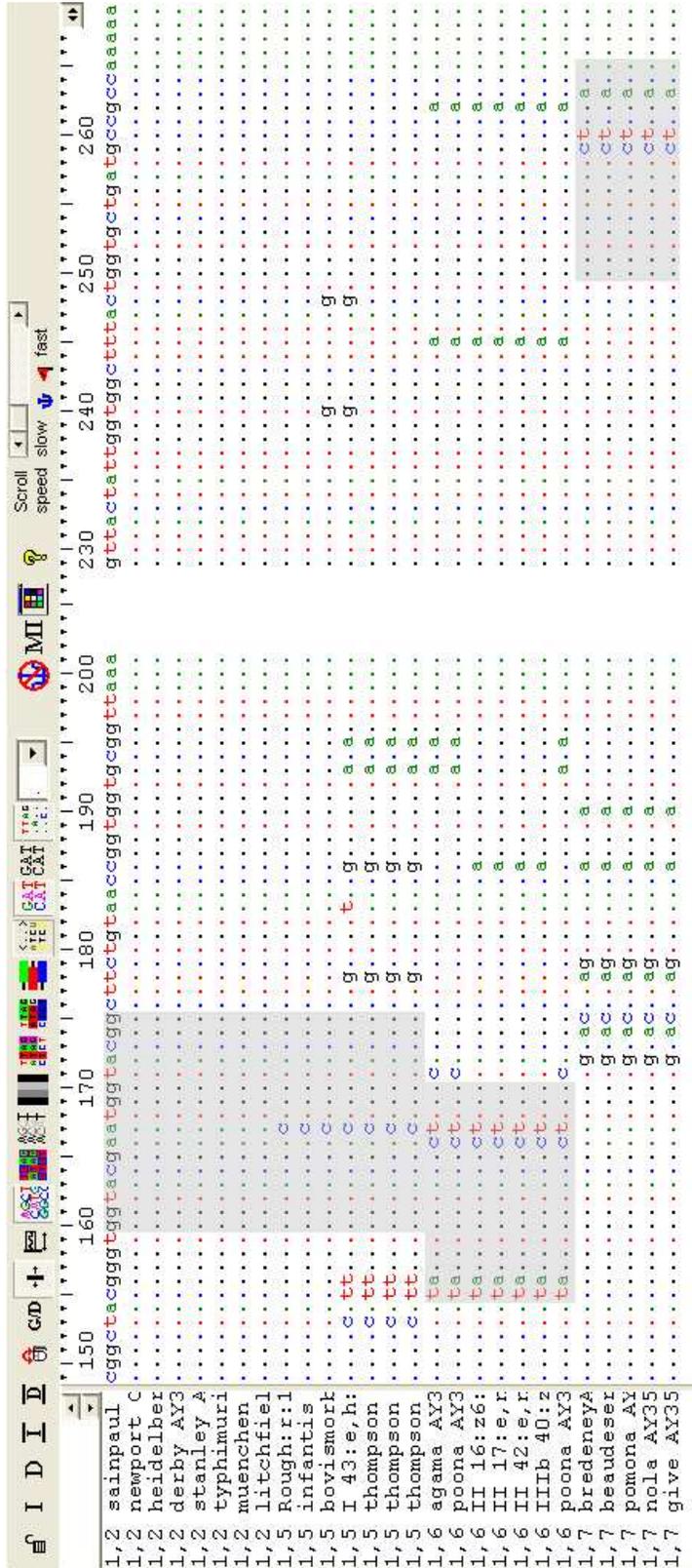


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de la región variable del gen *fljB* con el programa Bioedit 7.0.5.3 para detectar las diferencias. Las zonas grises corresponden a las regiones específicas para los distintos antígenos flagelares utilizadas como secuencias de las sondas de captura.

III.2. Detección de la región amplificada del gen *fljB*

El tamaño de los fragmentos amplificados fue el previsto para todas las cepas que expresan los distintos antígenos (519 pb para los factores antigénicos 1,2; 1,5; 1,6 y 1,7; y 504 pb para los factores antigénicos e,n,x; e,n,z₁₅; l,w; y z₆), comprobado con las bandas visualizadas en la electroforesis en gel de agarosa. En la figura 10 se muestran los resultados para los 8 antígenos estudiados.

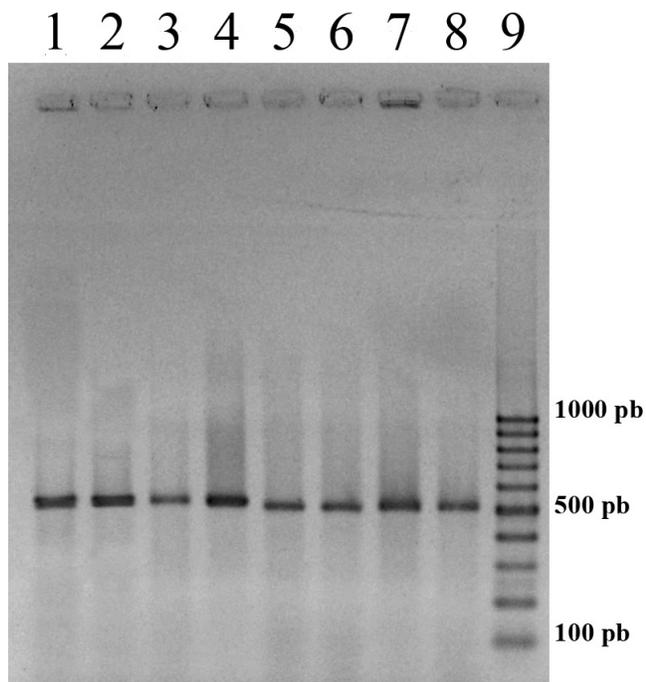


Figura 10. Resultados obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Línea 1, *S. Hilversum* (1,2); línea 2, *S. Champaign* (1,5); línea 3, *S. Dugbe* (1,6); línea 4, *S. Boecker* (1,7); línea 5, *S. II 39:l,z₂₈:e,n,x* (e,n,x); línea 6, *S. Luciana* (e,n,z₁₅); línea 7, *S. Mura* (l,w); línea 8, *S. Vietnam* (z₆); línea 9, marcador de peso molecular (100 pb CienMarker; Biodynamics).

III.3. Determinación de las condiciones óptimas de hibridación

III.3.1. Evaluación de distintas temperaturas

Con el objeto de determinar la temperatura óptima de hibridación se evaluaron diferentes temperaturas (45°C, 50°C, 54°C y 55°C) para lograr el grado de astringencia adecuado, minimizando la posibilidad de reacciones cruzadas inespecíficas y obteniendo una intensidad de señal lumínica apropiada para ser detectada por autoradiografía.

En la figura 11 se muestran los resultados de los ensayos a 45°C y a 50°C con las que si bien se alcanzó una buena respuesta en cuanto a la intensidad de la señal, se observó una hibridación inespecífica entre las muestras provenientes de cepas con antígeno H 1,5 y el oligonucleótido de captura H 1,2; en distintas concentraciones.

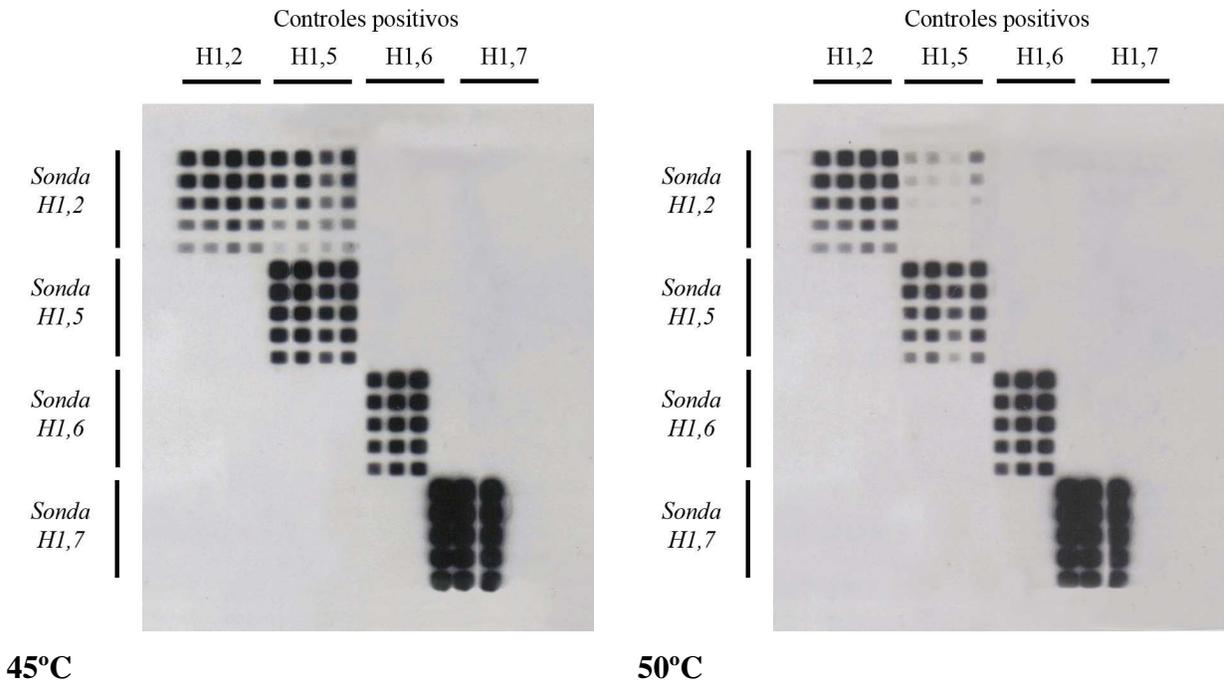


Figura 11. Resultados obtenidos en la RLBH a 45°C y 50°C con las cuatro sondas aplicadas en cantidades entre 12,5 y 200 pmoles. Los controles positivos fueron: *S. Hilversum*, *S. Landau*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi B* para H1,2; *S. Virchow*, *S. Choleraesuis*, *S. Manhattan*, *S. Mara* para H1,5; *S. Dugbe*, *S. II 57: z42:1,6*, *S. Neumuenster* para H1,6 y *S. Boecker*, *S. Guinea*, *S. Pomona* para H1,7.

En la figura 12 se muestran los resultados de la hibridación llevada a cabo a 55°C donde si bien se logró eliminar la hibridación inespecífica (entre el producto H1,5 y la sonda H1,2), el nivel de detección en las muestras correspondientes al antígeno H1,2 fue muy tenue. Por esa razón, se decidió bajar 1°C la temperatura de hibridación con el fin de producir un aumento en dicha señal.

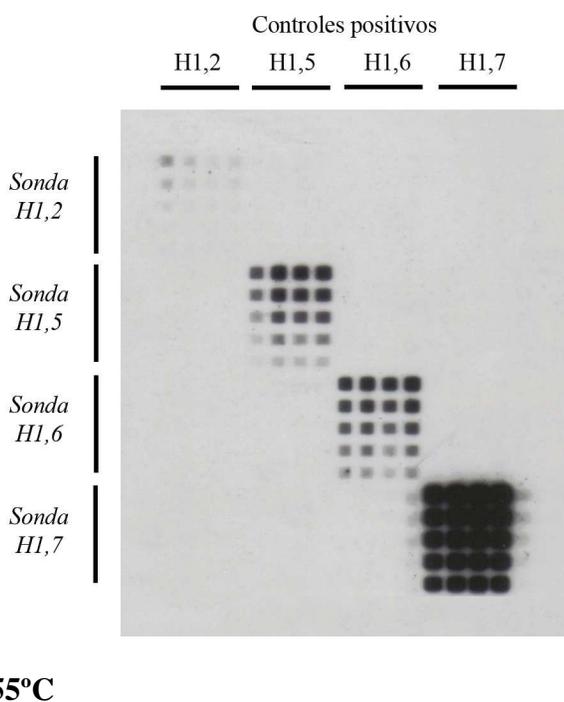


Figura 12. Resultados obtenidos en la RLBH a 55°C con las cuatro sondas aplicadas en cantidades entre 12,5 y 200 pmoles. Los controles positivos fueron: *S. Hilversum*, *S. Landau*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi B* para H1,2; *S. Champaign*, *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. Thompson* para H1,5; *S. Ponna*, *S. Dugbe*, *S. II 57: z42:1,6*, *S. Neumuenster* para H1,6 y *S. Carrau*, *S. Boecker*, *S. Grumpensis*, *S. Pomona* para H1,7.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos en la hibridación llevada a cabo a 54°C, con la que se pudo observar una buena intensidad lumínica en las muestras positivas y no se observaron hibridaciones inespecíficas entre los distintos productos de PCR y los oligonucleótidos. Tampoco se detectaron reacciones

cruzadas aun exponiendo la membrana al filme por un tiempo mucho más prolongado que el óptimo establecido.

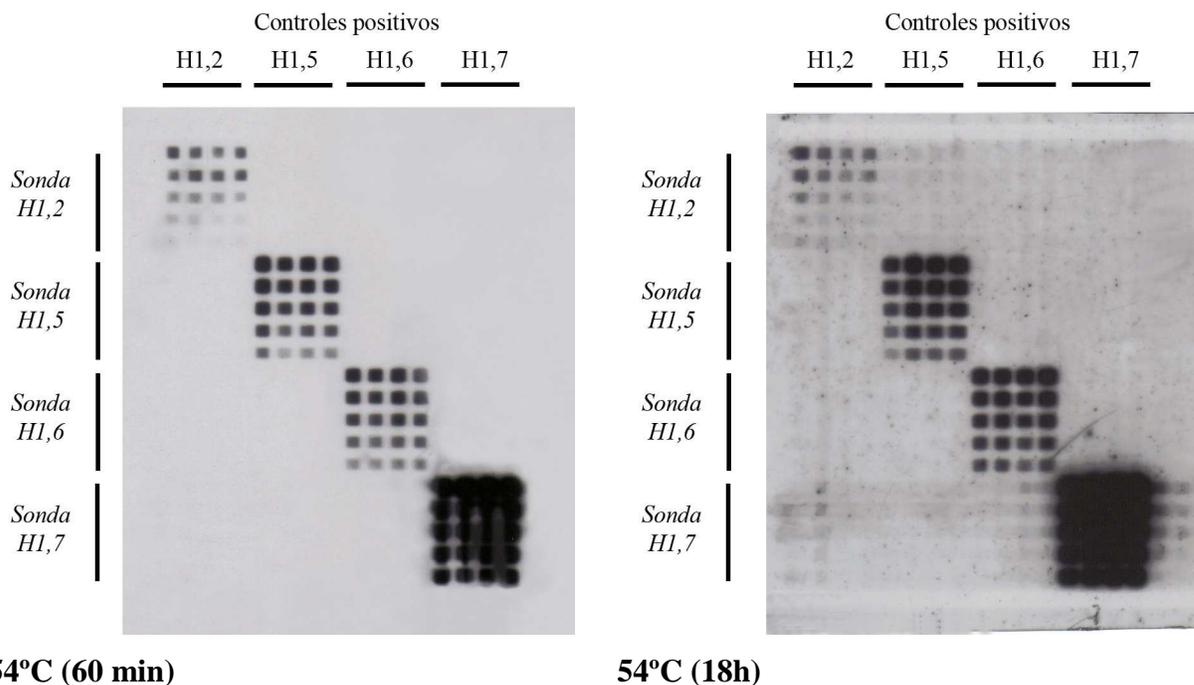


Figura 13. Resultados obtenidos en la RLBH a 54°C con exposición del filme de 60 min y 18 h con las cuatro sondas aplicadas en cantidades entre 12,5 y 200 pmoles. Los controles positivos fueron: *S. Hilversum*, *S. Landau*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi B* para H1,2; *S. Chanpaign*, *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. Thompson* para H1,5; *S. Ponna*, *S. Dugbe*, *S. II 57: z42:1,6*, *S. Neumuenster* para H1,6 y *S. Carrau*, *S. Boecker*, *S. Grumpensis*, *S. Pomona* para H1,7.

III.3.2. Determinación del tiempo de exposición

Con los ensayos realizados variando el tiempo de exposición entre la membrana y el filme, se determinó que luego de 45 a 60 min se obtenía una intensidad de señal que permitía la adecuada interpretación de los resultados.

III.3.3. Evaluación de las distintas concentraciones de sondas

Para determinar la concentración óptima de los nucleótidos a ser utilizados en la RLBH, se dispusieron en la membrana 150µL de cada una de las cuatro sondas

en diferentes cantidades (12,5; 25; 50; 100 y 200 pmoles). Luego, la membrana se hibridó a 54°C con los productos de PCR para los factores H1,2, H1,5, H1,6 y H1,7. La figura 14 muestra los resultados obtenidos, donde se observa que con la sonda H1,2, se obtuvo una señal óptima con 200 pmol, con las sondas H1,5 y H1,6 se obtuvieron señales óptimas con 100 a 200 pmol mientras que para la sonda H1,7 fue 12,5 pmol.

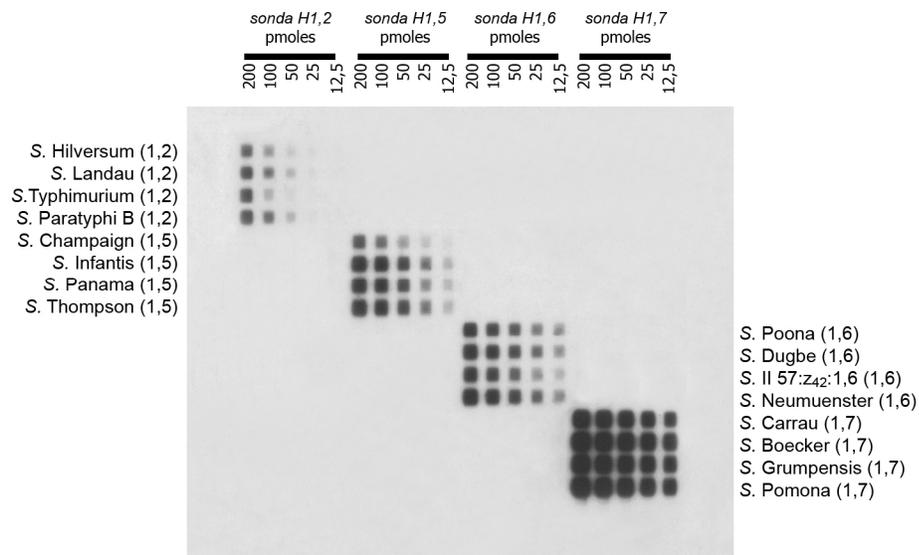


Figura 14. Resultados obtenidos en la optimización de las concentraciones de oligonucleótidos en la RLBH a 54°C con exposición de filme de 45 min.

Posteriormente se preparó una nueva membrana RLB con las concentraciones óptimas establecidas de oligonucleótidos, para los subsiguientes ensayos (Figura 15).

III.4. Evaluación de PCR-RLBH

En la tabla 7 se muestran los resultados de las 81 cepas estudiadas. Se evaluaron 13 cepas con el factor antigénico H1,2; 34 cepas con el factor antigénico H1,5; 13 cepas con el factor antigénico H1,6; 13 cepas con el factor antigénico H 1,7

y 2 cepas de cada uno de los siguientes factores antigénicos, He,n,x; He,n,z₁₅; H1,w; y Hz₆. Se obtuvo una concordancia total al comparar los resultados obtenidos por el método de PCR-RLBH con la técnica de serotipificación tradicional para los antígenos H1,2; H1,6 y H1,7. Para el antígeno H1,5; se obtuvieron cuatro resultados discordantes alcanzando una sensibilidad del 88,2%, una especificidad del 100% y un índice de concordancia Kappa de 0,89 con un grado de acuerdo casi perfecto. En la tabla 8 se muestra la correlación entre ambos métodos.

En todas las cepas ensayadas, se observó la amplificación del gen *fljB*, que codifica para los antígenos de la segunda fase flagelar, realizada con los cebadores HfIII_f y HfIII_b.

Luego de optimizar las condiciones en las que se debía llevar a cabo la RLBH (concentración de sonda, temperatura de hibridación y tiempo de exposición al filme):

- No se observaron hibridaciones inespecíficas entre las distintas sondas y los productos amplificados, aun cuando la diferencia entre las secuencias era de un nucleótido como ocurre entre las sondas para los factores antigénicos H1,2 y H1,5.
- Para 77 (95%) de las cepas ensayadas se obtuvieron señales de hibridación con sus correspondientes sondas.
- No se evidenció hibridación con la sonda específica en 4 (4,9 %) muestras correspondientes al factor H1,5 (*S. Nima*, *S. Riogrande*, *S. II 1,40*:z:1,5 y *S. II 58*:l,z₁₃,z₂₈:1,5). Para verificar si el resultado negativo se debía a factores inherentes a la hibridación, o a la presencia de polimorfismos no contemplados en las sondas fijadas en la membrana, se secuenció el producto de amplificación de *S. Nima*.

Tabla 7. Resultados de las 81 cepas de *Salmonella* evaluadas para tipificar la segunda fase flagelar.

Serovariedad (n)	Fórmula Antigénica	PCR	RLBH			
			1,2	1,5	1,6	1,7
<i>S. Aberdeen</i> (1)	11:i:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Hilversum</i> (1)	30:k:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Kirkee</i> (1)	17:b:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Landau</i> (1)	30:i:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Muenchen</i> (1)	6,8:d:1,2:[z ₆₇]	+	+	-	-	-
<i>S. Newport</i> (1)	6,8:e,h:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Paratyphi B</i> (3)	1,4,[5],12:b:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> (2)	1,4,[5],12:i:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Virchow</i> (1)	6,7,14:r:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Virginia</i> (1)	8:-:1,2	+	+	-	-	-
<i>S. Bahrenfeld</i> (1)	6,14,24:e,h:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Barielly</i> (1)	6,7,14:y:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Blockey</i> (1)	6,8:k:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Bovismorbificans</i> (1)	6,8:r,[i]:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Champaign</i> (1)	39:k:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Choleraesuis</i> (2)	6,7:c:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Eastbourne</i> (1)	1,9,12:e,h:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Egusi</i> (1)	41:d:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Infantis</i> (1)	6,7,14:r:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Javiana</i> (1)	1,9,12:l,z ₂₈ :1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Leipzig</i> (1)	41:z ₁₀ :1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Lexington</i> (1)	3,10[15][15,34]:z ₁₀ :1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Manhattan</i> (1)	6,8:d:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Mara</i> (1)	39:e,h:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Marseille</i> (1)	11:a:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Miami</i> (1)	1,9,12:a:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Muenster</i> (1)	3,10[15][15,34]:e,h:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Nima</i> (1)	28:y:1,5	+	-	-	-	-
<i>S. Onderstepoort</i> (1)	1,6,14,25:e,h:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Orion</i> (2)	3,10,[15][15,34]:y:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Panama</i> (1)	1,9,12:l,v:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Reading</i> (1)	1,4,[5],12:e,h:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Riogrande</i> (1)	40:b:1,5	+	-	-	-	-
<i>S. Thompson</i> (2)	6,7,14:k:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Uganda</i> (1)	3,10[15]:l,z ₁₃ :1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Utrecht</i> (1)	52:d:1,5	+	-	+	-	-
<i>S. Paratyphi A</i> (2)	1,2,12:a:[1,5]	+	-	+	-	-
<i>S. II 13,22:z₂₉:1,5</i> (1)	13,22:z ₂₉ :1,5	+	-	+	-	-
<i>S. II 1,40:z:1,5</i> (1)	1,40:z:1,5	+	-	-	-	-
<i>S. II 58:l,z₁₃,z₂₈:1,5</i> (1)	58:l,z ₁₃ ,z ₂₈ :1,5	+	-	-	-	-
<i>S. Anatum</i> (2)	3,10[15][15,34]:e,h:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Colombo</i> (1)	38:y:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Dugbe</i> (2)	45:d:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Inverness</i> (1)	38:k:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Kaolak</i> (1)	47:z:1,6	+	-	-	+	-

<i>S. London</i> (1)	3,10[15]:l,v:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Neumuenster</i> (1)	1,4,12,27:k:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Ponna</i> (2)	<u>1</u> ,13,22:z:1,6:[z ₄₄]	+	-	-	+	-
<i>S. Treforest</i> (1)	<u>1</u> ,51:z:1,6	+	-	-	+	-
<i>S. II 57</i> :z ₄₂ :1,6 (1)	57:z ₄₂ :1,6	+	-	-	+	-
<i>S. Boecker</i> (1)	[1],6,14,[25]:l,v:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Bredeney</i> (3)	<u>1</u> ,4,12,27:-:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Carrau</i> (2)	6,14,[24]:y:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Florida</i> (1)	[1],6,14,[25]:d:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Grumpensis</i> (2)	13,23:d:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Madelia</i> (1)	1,6,14,25:y:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Pomona</i> (1)	28:y:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Schwarzengrund</i> (1)	<u>1</u> ,4,12,27:d:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Strasbourg</i> (1)	9,46:d:1,7	+	-	-	-	+
<i>S. Baildon</i> (1)	9,46:a:e,n,x	+	-	-	-	-
<i>S. II 39</i> :l,z ₂₈ :e,n,x (1)	39:l,z ₂₈ :e,n,x	+	-	-	-	-
<i>S. Luciana</i> (1)	11:a:e,n,z ₁₅	+	-	-	-	-
<i>S. Surat</i> (1)	[1],6,14,[25]:r,[i]:e,n,z ₁₅	+	-	-	-	-
<i>S. Mura</i> (1)	1,4,12:z ₁₀ :lw	+	-	-	-	-
<i>S. Worthington</i> (1)	<u>1</u> ,13,23:z:l,w	+	-	-	-	-
<i>S. Cairina</i> (1)	3,10:z ₃₅ :z ₆	+	-	-	-	-
<i>S. Vietnam</i> (1)	41:b:z ₆	+	-	-	-	-

Tabla 8. Resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia entre la serotipificación tradicional y la PCR-RLBH

PCR-RLBH	Serotipificación tradicional							
	H1,2		H1,5		H1,6		H1,7	
	+	-	+	-	+	-	+	-
+	13	0	30	0	13	0	13	0
-	0	68	4	47	0	68	0	68
Total	13	68	34	47	13	68	13	68

En la siguiente figura se muestran los resultados de la RLBH luego de determinar las condiciones óptimas para el método.

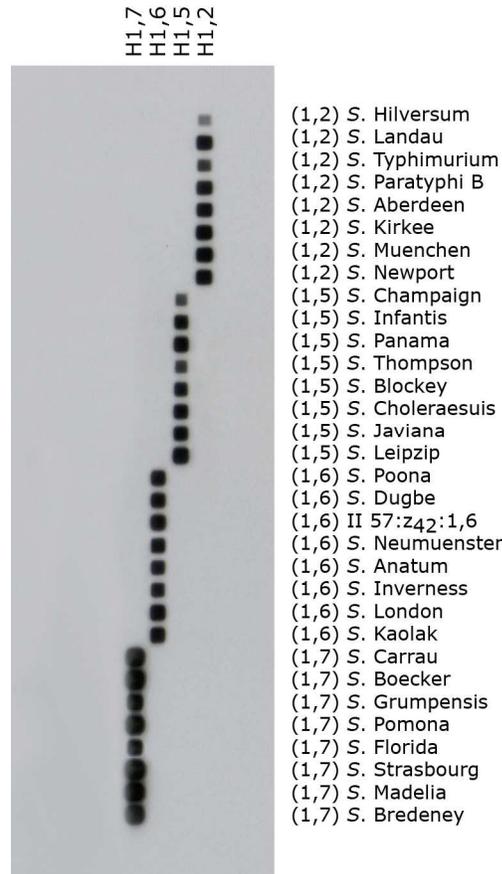


Figura 15. Resultados de la RLBH obtenidos en las condiciones de hibridación optimizadas con 200 pmol de sonda H1,2; 150 pmol de sonda H1,5 y H1,6; y 12,5 pmol de sonda H1,7 llevada a cabo a 54°C con exposición de filme de 45 min.

III.5. Reutilización de la membrana

Los resultados de la remoción de los productos de PCR y la rehibridación con nuevas muestras permitieron demostrar que la membrana puede ser reutilizada al menos 10 veces sin registrar pérdida significativa de señal con las concentraciones de sondas consideradas óptimas ni aparición de ruido de fondo (Figura 16).

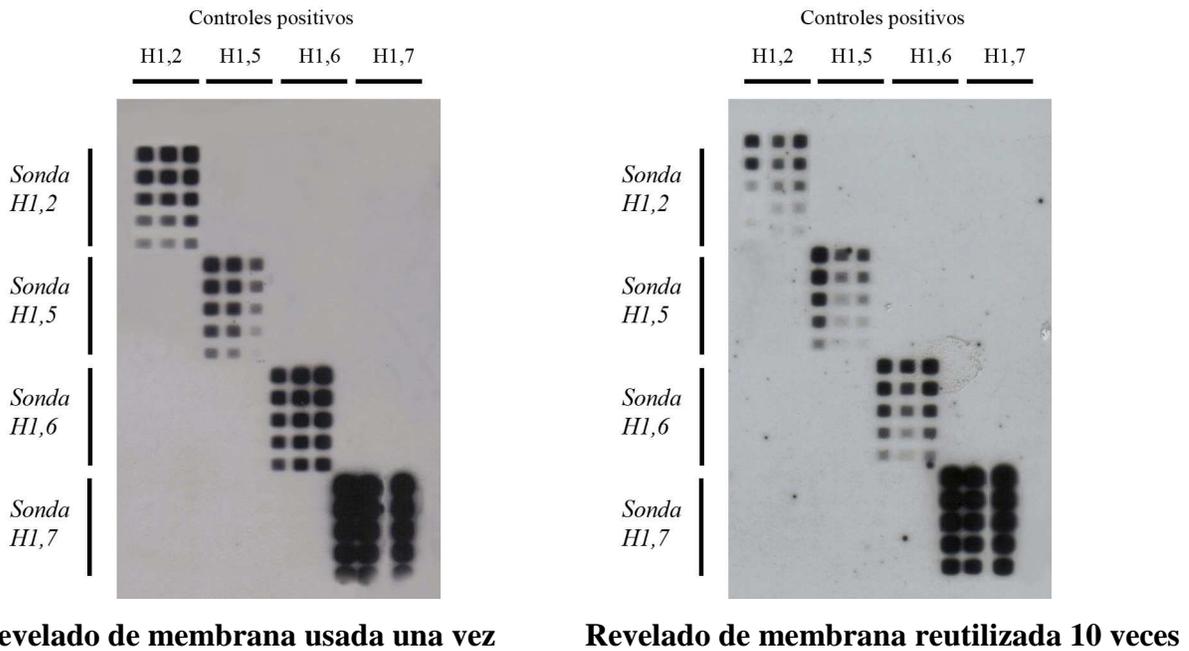


Figura 16. Resultados obtenidos del revelado de la RLBH con la membrana utilizada por primera vez y luego de reutilizarla por 10 veces con las cuatro sondas aplicadas en cantidades entre 12,5 y 200 pmoles. Los controles positivos fueron *S. Hilversum*, *S. Landau*, *S. Typhimurium*, para H1,2; *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. Thompson* para H1,5; *S. Ponna*, *S. Dugbe*, *S. II 57: z42:1,6*, para H1,6 y *S. Carrau*, *S. Boecker*, *S. Grumpensis*, para H1,7.

III.6. Secuenciación de las muestras negativas por PCR-RLBH

En la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA, Castelar, se realizó la secuenciación de la muestra correspondiente a la cepa *S. Nima* que no hibridó con la sonda H1,5.

En la figura 17 se comparan las secuencias de la región variable que codifican para los antígenos flagelares del complejo H1 y la secuencia obtenida de *S. Nima*. Los resultados permitieron demostrar polimorfismos dentro de la región correspondiente al sitio de captura de la sonda diseñada. En ambas muestras se observaron diferencias en los nucleótidos de las posiciones 645 (ACG→ACA) y 655 (GCT→CCT); esta última causa la sustitución del aminoácido alanina (Ala) por prolina (Pro) en el antígeno.

```

540...+...550...+...560...+...570...+...580...
fljB 1,2      TGTGAAAGATACAGCAGTAACAACGAAAGCTTATGCCAATAATGG
fljB 1,5      .....C.....G.....
fljB 1,6      .....A.....G.....
fljB 1,7      .....
S.Nima 1,5    .....N·A.....C.....A.....

+...590...+...600...+...610...+...620...+...
fljB 1,2      TACTACACTGGATGTATCGGGTCTTGATGATGCAGCTATTAAAGC
fljB 1,5      .....AC.....A·
fljB 1,6      .....CC·A·C.....A.....C.....
fljB 1,7      .....
S.Nima 1,5    .....A·C.....A·C·C.....

630...+...640...+...650...+...660...+...670...
fljB 1,2      GGCTACGGGTGGTACGAATGGTACGGCTTCTGTAACCGGTGGTGC
fljB 1,5      .....C.....
fljB 1,6      .....TA.....CT...C.....A·
fljB 1,7      .....G·AC·AG.....A·A·
S.Nima 1,5    T...TTA.....A·C.....C·...A.....G·A·

+...680...+...690...+...700...+...710...+...
fljB 1,2      GGTAAATTTGACGCAGATAATAACAAGTACTTTGTTACTATTGG
fljB 1,5      .....
fljB 1,6      A.....T.....
fljB 1,7      .....
S.Nima 1,5    .....T.....C.....

720...+...730...+...740...+...750...+...760...
fljB 1,2      TGGCTTTACTGGTGCTGATGCCGCCAAAATGGCGATTATGAAGT
fljB 1,5      .....
fljB 1,6      .....A.....A·
fljB 1,7      .....CT·A·
S.Nima 1,5    .....A.....G.....T·T·C·T.....G·

+...770...+...780...+...790...+...800...+...
fljB 1,2      TAACGTTGCTACTGACGGTACAGTAACCCTTGCGGCTGGCGCAAC
fljB 1,5      .....
fljB 1,6      .....C.....A.....C.....
fljB 1,7      .....
S.Nima 1,5    .....G·T·A·A·

```

Figura 17. Comparación de la región variable del gen *fljB* entre las secuencias nucleotídicas de las serovariedades estudiadas y la obtenida por la secuenciación de las serovariedades H1,5 de las muestras negativas en la hibridación. Las zonas sombreadas corresponden al sitio específico de las sondas de captura.

IV. DISCUSION

La salmonelosis constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial, por ser su agente causal responsable de la mayoría de los casos de ETA (Flint *et al.*, 2005).

La información de los aislamientos de las distintas serovariedades de *Salmonella* proporcionada por los laboratorios de Salud Pública se usa para monitorear la incidencia de salmonelosis en humanos y detectar posibles brotes, siendo la exactitud de la identificación de la serovariedad de suma importancia para la vigilancia.

La identificación de las distintas serovariedades está basada en el esquema de KW, que tiene en cuenta mediante reacciones de aglutinación, la presencia del antígeno somático “O”, la proteína flagelar de fase 1 (H1) y la proteína flagelar de fase 2 (H2) (Ewing, 1986; Grimont *et al.*, 2007). La técnica es simple pero presenta ciertas desventajas. Es necesario contar con antisueros de alta calidad y con cepas de referencia para evaluar y controlar dichos antisueros. Por otro lado puede haber dificultades con la expresión de algún antígeno, ya sea en el caso de cepas rugosas donde no se manifiesta correctamente el antígeno “O”; así como también en las cepas inmóviles que no expresan el antígeno flagelar, y en todas aquellas cepas donde no se observa alguna de sus fases de forma adecuada. Ante esta última situación, se deben llevar a cabo las inversiones de fase que resultan ser muy laboriosas y requieren personal muy calificado.

Estas dificultades junto con el tiempo que se demora para la obtención del resultado final, han motivado el desarrollo de métodos alternativos al uso de antisueros para identificar las distintas serovariedades de *Salmonella*. Se han probado técnicas moleculares, tales como la electroforesis de campo pulsado (PFGE), que se basa en el establecimiento y la comparación de patrones de bandas que no siempre se correlacionan con los resultados obtenidos en la serotipificación

tradicional y además no puede ser adaptado fácilmente para su aplicación en el laboratorio clínico de la microbiología.

En un estudio realizado en 1998 por Dauga y col., se compararon los resultados obtenidos por el análisis de restricción de los productos de amplificación de los genes flagelares de *Salmonella* y el método convencional de serotipificación. Se obtuvieron una gran variedad de patrones, cada uno de ellos generalmente asociado a más de un antígeno flagelar. Este tipo de análisis, si bien agrega información sobre los antígenos, no se emparenta exactamente con la obtenida por la aglutinación flagelar.

Burr y col., (1998) emplearon las técnicas de PCR basada en consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR) y de PCR con *primers* arbitrarios (AP-PCR) para evaluar la capacidad de distinguir o de identificar serovariedades y subtipos. Los resultados con ambos métodos, fueron patrones de bandas complejos que si bien discriminaron aislamientos, no se correlacionaron con las serovariedades.

La PCR múltiple es otro de los métodos desarrollados y muestra resultados alentadores (Echeita *et al.*, 2002; Herrera-León *et al.*, 2004). Estos ensayos han sido utilizados en la identificación de los genes que codifican para los antígenos de la primera y segunda fase flagelar correspondientes a las serovariedades más comunes, generando productos de amplificación que se corresponden con cada antígeno.

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo sistema de detección, sobre la plataforma Bio-Plex, basado en la hibridación de un producto de PCR biotilado y un grupo de partículas copuladas con sondas específicas de captura para determinados serogrupos de *Salmonella*. Este ensayo emplea la tecnología Luminex a través de la cual se pueden realizar análisis múltiples y detectar seis serogrupos O.

Con su aplicación se han alcanzado valores de especificidad superiores al 90,0% para la identificación y aunque existen algunos resultados discordantes, constituye una alternativa para la detección rápida de serogrupos de *Salmonella*. Sin embargo, es una técnica muy costosa y su utilización queda restringida a los laboratorios de referencia (Fitzgerald *et al.*, 2007).

La introducción de métodos genotípicos abre nuevas posibilidades para los estudios de tipificación de *Salmonella*. Los mismos tienen la ventaja de ser rápidos y específicos. Estas técnicas han sido desarrolladas ante la necesidad de dar un resultado rápido y seguro, pero para lograr la validación de las mismas, deben analizarse controles de cepas positivas y negativas en varios laboratorios y comparar los resultados con el método convencional.

El conocimiento de las secuencias nucleotídicas de los alelos flagelares de *Salmonella* han permitido desarrollar métodos genotípicos de identificación polimórfica sero-específica. El alto grado de homología presente en las regiones conservadas del gen *fljB* permitió diseñar un único par de cebadores para poder amplificar todos los alelos específicos de la segunda fase flagelar (*fljB*^{1,2}, *fljB*^{1,5}, *fljB*^{1,6}, *fljB*^{1,7}, *fljB*^{1,w}, *fljB*^{e,n,x}, *fljB*^{e,n,z15} y *fljB*^{z6}). El polimorfismo de los genes flagelares de *Salmonella*, atribuida a la variabilidad dentro de su región interna, ya ha sido demostrada (Dauga *et al.*, 1998). El análisis comparativo de estas secuencias variables internas ha permitido identificar regiones únicas en grupos y tipos de antígenos flagelares específicos. Aún queda por determinar si estas diferencias son simples marcadores para un antígeno particular o si son responsables de las diferencias antigénicas detectadas en la serotipificación. Cualquiera sea el caso, estas diferencias en la secuencia permiten una identificación molecular de los alelos que codifican para los diversos antígenos flagelares. Estas secuencias únicas fueron el blanco para el desarrollo de las sondas específicas para las secuencias que codifican para cada antígeno en particular.

Evaluación del ensayo de identificación de los genes que codifican para los antígenos flagelares.

En este estudio, el método de PCR-RLBH fue adaptado para genotipificar *Salmonella*. Dado que se conocen más de 100 antígenos flagelares distintos de *Salmonella*, el estudio estuvo limitado a un blanco genómico (gen *fljB*) de 4 antígenos diferentes del complejo H1 de la segunda fase flagelar en donde se observa un elevado grado de homología. Los genes que codifican para los antígenos flagelares 1,2, 1,5, y 1,6 del complejo se encuentran relacionados en más de 96,2% (Dauga *et al.*, 1998).

Se realizaron las pruebas para alcanzar las condiciones óptimas en la reacciones de PCR e hibridación, en las cuales se produjera un alineamiento altamente específico entre las sondas y los productos amplificados. Esta estandarización de la reacción de hibridación facilitó la identificación de secuencias con tan solo un nucleótido de diferencia, como en el caso de H:1,2 y H:1,5. Además, cuando se obtuvo producto de amplificación, sólo se observó la hibridación con la sonda complementaria a la secuencia. Estas pruebas iniciales demostraron resultados optimistas y crearon la base para una investigación más amplia de la identificación sero-específica por medio de PCR-RLBH. Los dos cebadores fueron diseñados considerando secuencias blanco conservadas para poder identificar entre ellos el polimorfismo del gen *fljB*, que se refleja en los distintos antígenos de la segunda fase. Se comprobó la reacción de amplificación esperada en la totalidad de las cepas ensayadas. Con respecto a los resultados de hibridación se observaron reacciones inespecíficas a temperaturas bajas (45-50°C) y muy intensas entre la sonda específica para H:1,5 y las cepas con antígeno H:1,2. Estas reacciones inespecíficas pudieron eliminarse en condiciones más astringentes cuando el ensayo se realizó a temperaturas mayores, concluyendo que a 54°C se obtenía una intensidad de señal apropiada.

Una vez determinada las condiciones óptimas de la técnica, se probó un panel de 81 cepas para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Los resultados mostraron una concordancia total entre la PCR-RLBH y la serotipificación obteniéndose una hibridación específica entre todos los productos amplificados y sus respectivas sondas, salvo para el caso de cuatro serovariedades con antígeno H:1,5. Para estas muestras, si bien se obtuvo un producto de amplificación, no se observó hibridación con la sonda específica. El resultado de la secuenciación de una de las mismas demostró la existencia de polimorfismos dentro de las secuencias de nucleótidos que codifican para el antígeno H:1,5. Esto debería ser considerado para la síntesis de nuevas sondas para ser incluidas en una nueva membrana.

Ventajas del uso de PCR-RLBH.

Además de demostrar la capacidad de discriminar entre secuencias de solo un nucleótido de diferencia, la técnica de PCR-RLBH proporciona varias ventajas. Una de ellas es la reproducibilidad de la técnica basada en la homogeneidad de los oligonucleótidos sintetizados y la reutilización de la membrana sin modificación de los resultados.

Otra ventaja de esta técnica fue la sensibilidad proporcionada por la PCR. En todas las serovariedades de *Salmonella* ensayadas se observó la amplificación de la fracción del gen *fljB*.

Por otro lado, el ensayo de hibridación permitió la detección molecular de grupos H de *Salmonella*, en serovariedades que no manifiestan dicho antígeno flagelar. Se obtuvieron resultados positivos para el gen del antígeno H:1,5 en dos cepas de *S. Paratyphi A* (1,2,12:a:[1,5]) en las que el antígeno se encuentra en forma muy excepcional en los aislamientos, y se habían obtenido resultados negativos con

la serotipificación. Estos resultados revelan una ventaja de este método molecular al aportado por el uso de antisueros ya que proporcionarían una información adicional de la serovariedad en cepas que no invierten o expresen sus fases flagelares.

La técnica puede completarse en un día y medio de trabajo. El tiempo necesario para llevar a cabo una PCR es de 4 horas, mientras que para la hibridación y detección son necesarias 7 horas. La utilización del *miniblotter* para fijar las sondas y distribuir las muestras uniformemente sobre la membrana, permite procesar una gran cantidad de muestras con las distintas sondas específicas. En una sola hibridación se pueden ensayar simultáneamente 43 muestras con un máximo de 43 sondas distintas. Además, el uso de un sustrato revelador no precipitante como el ECL, admite la remoción de las muestras en la membrana, sin afectar a los oligonucleótidos fijados, permitiendo su reutilización por un mínimo de 10 veces sin pérdida significativa de señal entre las experiencias.

Por otra parte, debido a que la técnica una vez estandarizada es robusta, cumple con los requisitos para poder ser adaptada a un formato comercial, de utilización en laboratorios de referencia.

Para incrementar el espectro de identificación de cepas de *Salmonella* se continuará con las siguientes actividades:

- Diseñar e incorporar una segunda sonda H1,5 para permitir detectar todas aquellas serovariedades que presentan el polimorfismo encontrado.
- Diseñar oligonucleótidos de captura para ampliar el rango de identificación de cepas, en particular para aquellas que portan los antígenos de mayor prevalencia de la segunda fase flagelar (He,n,x, He,n,z₁₅, Hl,w y Hz₆), comprobar la especificidad, sensibilidad y condiciones de hibridación para que puedan ser incorporadas a la membrana.

- Continuar evaluando secuencias que codifican para los antígenos flagelares del complejo 1 con el objeto de buscar serovariedades que presenten zonas polimórficas en el sitio de unión a la sonda, realizar la secuenciación de los mismos y desarrollar la hibridación necesaria para poder detectarlos.

- Desarrollar cebadores y sondas específicas para la primera fase flagelar y determinar la factibilidad de ser incorporadas en una misma membrana de hibridación.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en este trabajo, en el que se utilizó por primera vez este método para la tipificación molecular de *Salmonella*, así como las posibilidades que brinda esta técnica en cuanto a rapidez, facilidad de ejecución y confiabilidad de los resultados, consideramos que en un futuro, estos tipos de métodos pueden convertirse en una herramienta de gran valor para la determinación de serovariedades de *Salmonella* pudiendo complementar y hasta reemplazar los métodos tradicionales de serotipificación. Las actividades desarrolladas en el presente trabajo permitieron cumplir con los objetivos propuestos y demostrar la hipótesis planteada.

V. CONCLUSIONES

1. El método diseñado para la detección de los genes que codifican para los antígenos flagelares de *Salmonella* por PCR-RLBH permitió detectar 4 secuencias diferentes de alta homología entre sí, demostrando una concordancia total cuando se lo comparó con la técnica de referencia (serotipificación).

2. La PCR-RLBH es específica ya que no se observó reactividad cruzada con otras secuencias correspondientes a antígenos relacionados.

3. Es un método simple, sensible y rápido comparado al convencional, reduciendo el diagnóstico de varios días (semanas en la mayoría de los casos) a 12 horas ya que no es necesario esperar para el crecimiento de la bacteria, para la exaltación de la movilidad e inversión de fase.

4. Se demostró el polimorfismo en la secuencia de unión a la sonda H1,5; en una de las cepas que no hibridaron (*S. Nima*), mediante la secuenciación del gen *fljB*.

5. Es la primera vez que se diseña un método de estas características para la tipificación molecular de *Salmonella*, la cual puede complementar y hasta reemplazar a las técnicas de referencia empleadas hasta entonces, contribuyendo con el estudio de la epidemiología de las ETA.

Conclusión general: El trabajo desarrollado permitió demostrar la hipótesis planteada cumplimentando con los objetivos propuestos, ya que el método permite la identificación de las secuencias del gen *fljB* que codifican para los distintos antígenos flagelares del complejo H1 de *Salmonella*, sin requerir la inversión de fase, pudiendo detectar además la presencia de genes que no se expresan.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anderson ES. Drug resistance in *Salmonella* Typhimurium and its implications. Br Med J. 1968; 10: 333-9.
- Anderson ES, Ward LR, De Saxe MJ, Old DC, Barker R, Duguid JP. Correlation of phage type, biotype and source in strains of *Salmonella* Typhimurium. J Hyg (Lond). 1978; 81: 203-17.
- Baggesen DL, Wegener HC, Madsen M. Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 1, 4, or 6 to phage type 7 with loss of lipopolysaccharide. J Clin Microbiol. 1997; 35: 330-3.
- Boletín Epidemiológico Periódico. Ministerio de Salud. N°30, “*Salmonella*” 2006. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/boletin_BEP30.pdf.
- Boletín Semanal de Notificaciones 2002. Ministerio de Salud. N°52, 2003. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/02_Bonr53.xls.
- Boletín Semanal de Notificaciones 2003. Ministerio de Salud. N°53, 2004. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/03_bonr51.xls.
- Boletín Semanal de Notificaciones 2004. Ministerio de Salud. N°52, 2005. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/04_Bonr52.xls.
- Boletín Semanal de Notificaciones 2005. Ministerio de Salud. N°52, 2006. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/05_bonr54.xls.
- Boletín Semanal de Notificaciones 2006. Ministerio de Salud. N°52, 2007. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/06_bonr51.xls.
- Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. J Bacteriol. 2003; 185: 3567–74.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2465–7.

- Brock. Biology of Microorganisms, 9th edition, chapter 4. Madigan MT, Martinko JM and Parker J, Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, 2000.
- Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. Lett Appl Microbiol. 1998; 27: 24-30.
- Cockerill FR 3rd. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Feb 43: 199-212.
- Crum-Cianflone NF. Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. Curr Gastroenterol Rep. 2008; 10: 424-31.
- Dauga C, Zabrovskaja A, Grimont PA. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2835-43.
- Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Res Microbiol. 2002; 153: 107-13.
- Esteban E, Snipes K, Hird D, Kasten R, Kinde H. Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. J Clin Microbiol. 1993; 31: 233-37
- Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 1986; 4th edition. Elsevier Science Publishing Co; Inc; New York.
- Farmer JJ 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, Steigerwalt AG, O'hara CM, Morris GK, Smith PB, Brenner DJ. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1985; 21: 46-76.
- Fitzgerald C, Collins M, van Duyne S, Mikoleit M, Brown T, Fields P. Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. J Clin Microbiol. 2007; 45: 3323-34
- Flint JA, Van Duynhoven YT, Angulo FJ, DeLong SM, Braun P, Kirk M, Scallan E, Fitzgerald M, Adak GK, Sockett P, Ellis A, Hall G, Gargouri N, Walke H, Braam

- P. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 698-704.
- Gershman M. Single phage-typing set for differentiating salmonellae. *J Clin Microbiol.* 1977; 5: 302-14.
 - Gershman M, Markowsky G. Reduced set of phages for typing salmonellae. *J Clin Microbiol.* 1983; 17: 240-4.
 - Grimont PAD and Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 2007; 9th edition. World Health Organization.
 - Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999; 41: 95-8.
 - Herikstad H, Motarjemi R, Tauxe RV. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infectol.* 2002; 129: 1-8.
 - Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2581–6.
 - Hunter PR and Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin. Microbiol.* 1988; 26; 2465-6.
 - Joys TM. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with other flagellins. *J Biol Chem.* 1985; 260: 15758-61.
 - Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 907-14.
 - Kong F, Brown M, Sabananthan A, Zeng X, Gilbert G L. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay to identify 23 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide vaccine serotypes. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1887-91.

- Le Minor L and Popoff MY. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. Int J Syst Bacteriol. 1987; 37: 465-8
- Li J, Nelson K, McWhorter AC, Whittam TS, Selander RK. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91: 2552-6.
- Lim BK, Thong KL. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. J Infect Dev Ctries. 2009; 3: 420-8.
- Lindberg AA, Le Minor L 1984. Serology of *Salmonella*. In: Bergan T (ed) Methods in microbiology, vol. 15. Academic Press, London, pp 1 - 14 1.
- Luk JM, Kongmuang U, Reeves PR, Lindberg AA. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). J Clin Microbiol. 1993; 31: 2118-23.
- Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev. 1988; 1: 228-43.
- McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, Gheesling L, Brenner F, Fields PI. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *fliA* from *Salmonella*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1923-32.
- Michelena G. Producción segura de cárneos y lácteos – análisis de la contaminación. 2008.
<http://www.ms.gba.gov.ar/Laboratorio/Departamentos/ProduccionCarneosLacteos.pdf>.
- Nair S, Lin TK, Pang T, Altwegg M. Characterization of *Salmonella* serovars by PCR–single-strand conformation polymorphism analysis J Clin Microbiol. 2002; 40: 2346–51.
- Pérez E, Aguiar P, Salvatella R, Ribetto A, Castro A. Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): su importancia en la

- caracterización de riesgos. 2003. http://www.aam.org.ar/actividades/T_ETA.pdf.
- Playford EG, Kong F, Sun Y, Wang H, Halliday C, Sorrell TC. Simultaneous detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 876-80.
 - Popoff MY. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th ed. Institute Pasteur, Paris, France.
 - Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ 3rd. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 313-20.
 - Ríos RM, Araya RP, Fernández R A, Tognarelli J, Hormazábal JC, Fernández O J. Molecular subtyping of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in a post epidemic period. *Rev Med Chil*. 2009; 137: 71-5.
 - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition, chapter 6. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
 - Shands JW Jr, Chun PW. The dispersion of gram-negative lipopolysaccharide by deoxycholate. Subunit molecular weight. *J Biol Chem*. 1980; 255: 1221-6.
 - Silverman M, Zieg J, Hilmen M, Simon M. Phase variation in *Salmonella*: Genetic analysis of a recombinational switch. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 391-5.
 - Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Hansen LM, Hird DW, Carpenter TE, McCapes RH. Use of an rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 1847-53.
 - Tauxer R. Emerging Foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3: 425-34.
 - Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by

- pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-39.
- Thong KL, Cheong YM, Puthucheary S, Koh CL, Pang T. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1135-41.
 - Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pang T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1070-74.
 - van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 779-87.
 - Verma NK, Quigley NB, Reeves PR. O-antigen variation in *Salmonella* spp.: rfb gene clusters of three strains. *J Bacteriol.* 1988; 170: 103-7.
 - Wassermann MM, Saphra I The use of bacteriophages in typing *Salmonella* cultures. *J Bacteriol.* 1955; 69: 97-100.
 - WHO. Global Salm-Surv Strategic Plan, 2006 - 2010. Report of a meeting, Winnipeg, Canada, 14-15 September 2005.
http://www.who.int/entity/salmsurv/general/documents/GSS_STRATEGICPLAN2006_10.pdf.
 - WHO. Water-related diseases: typhoid and paratyphoid enteric fevers. 2007.
http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/typhoid/en/.
 - Zhao Z, Kong F, Gilbert GL. Reverse line blot assay for direct identification of seven *Streptococcus agalactiae* major surface protein antigen genes. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13: 145-9.

Anexo 1.

Tabla de fórmulas antigénicas de las serovariedades empleadas en el ensayo

Serovariedad	Antígeno somático "O"	Antígeno flagelar	
		Fase 1	Fase 2
Aberdeen	11	i	1,2
Anatum	3,10[15][15,34]	e,h	1,6
Bahrenfeld	6,14,24	e,h	1,5
Barielly	6,7,14	y	1,5
Blockey	6,8	k	1,5
Bovismorbificans	6,8	r,[i]	1,5
Bredeney	1,4,12,27	l,v	1,7
Carrau	6,14,[24]	y	1,7
Champaign	39	k	1,5
Choleraesuis	6,7	c	1,5
Colombo	38	y	1,6
Dugbe	45	d	1,6
Eastbourne	1,9,12	e,h	1,5
Egusi	41	d	1,5
Enteritidis	1,9,12	[f],g,m,[p]	[1,7]
Florida	[1],6,14,[25]	d	1,7
Grumpensis	13,23	d	1,7
Guinea	1,44	z ₁₀	1,7
Hilversum	30	k	1,2
II	1,40	z	1,5
II	58	1,z ₁₃ ,z ₂₈	1,5
II	57	z ₄₂	1,6
II	47	a	1,7
II	13,22	z ₂₉	1,5
Infantis	6,7,14	r	1,5
Inverness	38	k	1,6
Javiana	1,9,12	1,z ₂₈	1,5
Kaolak	47	z	1,6
Kirkee	17	b	1,2
Landau	30	i	1,2
Leipzig	41	z ₁₀	1,5
Lexington	3,10[15][15,34]	z ₁₀	1,5
Lomita	6,7	e,h	1,5
London	3,10[15]	l,v	1,6
Madelia	1,6,14,25	y	1,7
Manhattan	6,8	d	1,5
Mara	39	e,h	1,5
Marseille	11	a	1,5
Miami	1,9,12	a	1,5
Muenchen	6,8	d	1,2
Muenster	3,10[15][15,34]	e,h	1,5
Neumuenster	1,4,12,27	k	1,6
Newport	6,8	eh	1,2
Nima	28	y	1,5
Onderstepoort	1,6,14,25	e,h	1,5

Orion	3,10,[15][15,34]	y	1,5
Panama	<u>1</u> ,9,12	l,v	1,5
Paratyphi A	<u>1</u> ,2,12	a	[1,5]
Paratyphi B	<u>1</u> ,4,[5],12	b	1,2
Pomona	28	y	1,7
Poona	<u>1</u> ,13,22	z	1,6]
Reading	<u>1</u> ,4,[5],12	e,h	1,5
Riogrande	40	b	1,5
Schwarzengrund	<u>1</u> ,4,12, <u>27</u>	d	1,7
Strasbourg	9,46	d	1,7
Thompson	6,7,14	k	1,5
Treforest	<u>1</u> , <u>51</u>	z	1,6
Typhimurium	<u>1</u> ,4,[5],12	i	1,2
Typhimurium CO	<u>1</u> ,4,12	i	1,2
Uganda	3,10[15]	l,z ₁₃	1,5
Utrecht	52	d	1,5
Virchow	6,7, <u>14</u>	r	1,2
Virginia	8		1,2
Wichita	<u>1</u> ,13,23	d	1,6

Anexo 2.**Soluciones de trabajo**

SFF 1%: NaCl 8,5 g/L; formalina 1% v/v.

Solución salina 2%: NaCl 20g/L.

SFF 0,5%: NaCl 8,5 g/L; formalina 0,5% v/v.

Buffer SSPE 20x : Na₂HPO₄ · 2 H₂O 0,1 M; NaCl 1,8 M; EDTA 10mM; pH 7,4.

SDS (dodecil sulfato de sodio) 10% (en agua).

EDAC: [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] 16% (en agua).

Solución de hibridación: Buffer SSPE 2x / 0,1% SDS.

Soluciones de lavados: Buffer SSPE 2x / 0,5% SDS y Buffer SSPE 2x.

Buffer TAE 50x: Trizma Base 2M; ácido acético 0,65 mM; EDTA 0,1M.

Anexo 3.**Preparación de medios de cultivo**

TSB: *Tryptic Soy Broth* (DIFCO Laboratorios) 30 g/L.

TSA: *Tryptic (Trypticase) Soy Agar* (DIFCO Laboratorios) 40 g/L.

Medio semisólido de Cragie: Caldo nutritivo 1L; agar 4g; KNO₃ 1g.

Agar Sangre 5%: TSA; sangre de caballo 5% v/v.

Anexo 4.**Tabla de lectura de resultados para aglutinación en lámina**

Observación	Resultado
No hay aglutinación y el líquido es claro, turbio, o no cambia	Negativo
Aglutinación leve y el líquido está nublado	Trazas
-25% de las células han aglutinado y el líquido es opaco	1+
-50% de las células han aglutinado y el líquido está moderadamente nublado	2+
-75% de las células han aglutinado y el líquido está levemente nublado	3+
-100% de las células han aglutinado y el líquido está claro	4+

Anexo 5.**Tabla de lectura de resultados para aglutinación en tubo**

Observación	Resultado
Se forma una aglutinación flocular, que puede bajar al fondo del tubo quedando el sobrenadante claro	Completa
Se forman algunos flóculos, pero el sobrenadante aparece turbio.	Parcial
No hay aglutinación visible, el sobrenadante permanece turbio.	Negativa

Anexo 6.

Tabla X. Fórmulas antigénicas de *Salmonella* y secuencia de genes.

Serovariedad	Fórmula Antigénica	Alelo secuenciado	Nº acceso GenBank
Heidelberg	1,4,5,12:r:1,2	<i>fljB</i> ^{1,2}	AY353265
Derby	1,4,5,12:f,g:[1,2]	<i>fljB</i> ^{1,2}	AY353266
Stanley	4,5,12:d:1,2	<i>fljB</i> ^{1,2}	AY353267
Typhimurium	1,4,5,12:i:1,2	<i>fljB</i> ^{1,2}	AY353268
Muenchen	6,8:d:1,2	<i>fljB</i> ^{1,2}	AY353269
Litchfield	6,8:l,v:1,2	<i>fljB</i> ^{1,2}	AY353271
Rough:r:1,5	Rough:r:1,5	<i>fljB</i> ^{1,5}	AY353280
Infantis	6,7,14:r:1,5	<i>fljB</i> ^{1,5}	AY353282
Bovismorbificans	6,8:r:1,5	<i>fljB</i> ^{1,5}	AY353283
Thompson	6,7,14:k:1,5	<i>fljB</i> ^{1,5}	AY353285
Agama	4,12:i:1,6	<i>fljB</i> ^{1,5}	AY353294
Poona	1,13,22:z:1,6	<i>fljB</i> ^{1,6}	AY353295
II	16:z6:1,6	<i>fljB</i> ^{1,6}	AY353529
II	17:e,n,x,z ₁₅ :1,6	<i>fljB</i> ^{1,6}	AY353530
II	42:e,n,x:1,6	<i>fljB</i> ^{1,6}	AY353528
IIIb	40:z39:1,6	<i>fljB</i> ^{1,6}	AY353531
Bredeney	1,4,12,27:l,v:1,7	<i>fljB</i> ^{1,7}	AY353296
Beaudesert	1,6,14,25:e,h:1,7	<i>fljB</i> ^{1,7}	AY353297
Nola	6,8:e,h:1,7	<i>fljB</i> ^{1,7}	AY353298
Pomona	28:y:1,7	<i>fljB</i> ^{1,7}	AY353299
Give	3,10:l,v:1,7	<i>fljB</i> ^{1,7}	AY353300
Kambole	6,7:d:1,2,7	<i>fljB</i> ^{1,2,7}	AY353275
Eingedi	6,7:f,g,t.1,2,7	<i>fljB</i> ^{1,2,7}	AY353276
IIIb	6,7:l,v:1,5,7	<i>fljB</i> ^{1,5,7}	AY353273
IIIb	48:l,w:1,5,7:z50	<i>fljB</i> ^{1,5,7}	AY353274
Singapore	6,7:k:e,n,x	<i>fljB</i> ^{e,n,x}	AY353305
Chester	1,4,5,12:e,h:e,n,x	<i>fljB</i> ^{e,n,x}	AY353307
Brandenburg	1,4,5,12,27:l,v:e,n,z ₁₅	<i>fljB</i> ^{e,n,z₁₅}	AY353323
Braenderup	6,7,14:e,h,e,n,z ₁₅	<i>fljB</i> ^{e,n,z₁₅}	AY353324
Ohio	6,7:b:l,w	<i>fljB</i> ^{l,w}	AY353331

Gloucester	1,4,12,27:i:l,w	<i>fljB</i> ^{l,w}	AY353332
IIIb	61:i:z	<i>fljB</i> ^z	AY353335
IIIb	48:i:z	<i>fljB</i> ^z	AY353336
Bere	47:z4,z23:z6	<i>fljB</i> ^{z6}	AY353352
Weltevreden	3,10:r:z6	<i>fljB</i> ^{z6}	AY353353

Anexo 7.**Tabla de doble entrada para la evaluación de los resultados:**

Método en Estudio	Método de Referencia		Total
	+	-	
+	A	C	A + C
-	D	B	D + B
Total	A + D	C + B	N

- A: positivos verdaderos, resultados positivos por ambos métodos
- B: negativos verdaderos, resultados negativos por ambos métodos
- C: falsos positivos, resultados positivos por el método en estudio y negativos por el método de referencia
- D: falsos negativos, resultados negativos por el método en estudio y positivos por el método de referencia

Fórmulas utilizadas para el cálculo de la sensibilidad, la especificidad y la concordancia:

Sensibilidad = A (positivos verdaderos) x 100 / Total (+)

Especificidad = B (negativos verdaderos) x 100 / Total (-)

Concordancia Kappa = $\frac{Po - Pe}{1 - Pe}$

Siendo Po la proporción de acuerdos observados y Pe la proporción de acuerdos esperados.

Cálculo de $Po = \frac{A + B}{N}$

Cálculo de $Pe = \frac{(A+D)(A+C) + (C+B)(D+B)}{N^2}$

kappa	grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
>0,00 - 0,20	insignificante
0,21 - 0,40	discreto (bajo)
>0,41 - 0,60	moderado
0,61 - 0,80	sustancial (bueno)
0,81 - 1,00	casi perfecto (muy bueno)