

Aislamiento e identificación molecular de *Salmonella* spp., a partir de muestras de agua de consumo humano

(Isolation and Molecular Identification of *Salmonella* Spp., from Water Samples for Human Consumption)

Favian Bayas-Morejón*, Sonia Salazar-Ramos, Katherin Beltrán, Luis Verdezoto

Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico, Departamento de Investigación y Vinculación, Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Guaranda 020150, Ecuador

fbayas@ueb.edu.ec, ssalazar@ueb.edu.ec, kbeltran@ueb.edu.ec, lverdezoto@ueb.edu.ec

Resumen: El objetivo del estudio fue evaluar la ocurrencia de *Salmonella* spp. en 100 muestras de agua, recolectadas de cinco áreas de la ciudad de San José de Chimbo, prov. Bolívar. Todas las muestras de agua fueron filtradas mediante el uso de una rampa de succión y filtros de membrana y luego cultivadas utilizando métodos específicos para el género de interés y los aislados obtenidos fueron confirmados mediante microscopía y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Tras los análisis, se detectó el patógeno en el 10% de las muestras de agua analizadas. El mayor número de muestras contaminantes se encontró en las fuentes de consumo directo, a diferencia de las muestras obtenidas directamente del talud que no parecían estar contaminadas.

Palabras clave: *Salmonella* spp, caracterización, agua potable.

Abstract: The objective of the study was to evaluate the occurrence of *Salmonella* spp. in 100 water samples, collected from five areas of the city of San José de Chimbo, prov. Bolivar. All the water samples were filtered using a suction ramp and membrane filters and then cultured using specific methods for the genus of interest and the isolates obtained were confirmed by microscopy and PCR (Polymerase Chain Reaction). After analyzes the pathogens were detected in 10% of the analyzed water samples. The highest number of contaminating samples was found in the sources of direct consumption, unlike the samples obtained directly from the slope that did not appear to be contaminated.

Keywords: *Salmonella* spp., characterization, drinking water.

1. INTRODUCCIÓN

Mientras que los países en desarrollo continúan luchando con el tema de la inocuidad de los alimentos, es decir, la cantidad de alimentos suficiente para el consumo de la población en crecimiento; Existe otro dilema en estos países, se estima que más de 200 tipos de enfermedades producidas por patógenos son de transmisión alimentaria, causando problemas en grupos vulnerables, por lo que garantizar una alimentación saludable es un desafío para la salud pública [1]. Entre estos patógenos se encuentra el género *Salmonella* spp. [2]. Durante los últimos años, *Salmonella* spp. Ha venido siendo uno de los agentes causales más importantes de enfermedades transmitidas por alimentos en países desarrollados y en vías de desarrollo y es una de las principales causas de enteritis bacteriana aguda en personas en todo el mundo, además, se asocia comúnmente con ganado y aves de corral [3]. Para la identificación de las especies de *Salmonella* se han desarrollado métodos de identificación más rápidos y con mayor especificidad que los

convencionales, entre los que se encuentran la PCR y la PCR Multiplex [4]. El presente estudio fue diseñado con el objetivo de conocer la ocurrencia de *Salmonella* en agua mediante métodos de cultivo y moleculares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colección de muestra

El presente estudio fue descriptivo, experimental, transversal, realizado durante los meses de marzo a octubre de 2018, donde se determinó la presencia de *Salmonella* en 100 muestras de aguas para consumo humano en cinco áreas o localidades de la ciudad de San José de Chimbo, Ecuador (Tabla 1). Todas las muestras fueron transportadas y analizadas en un periodo no mayor a 4 horas partiendo desde el momento de la toma, Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Bolívar.

Tabla 1. Áreas de muestreo de agua

Área	Área de muestreo de agua	Nº de muestras
1	Restaurantes	15
2	Centros educativos	25
3	Viviendas privadas	18
4	Lugares públicos	32
5	Vertientes principales y secundarias	10
Total		100

2.2. Técnica y proceso para la recolección de muestras

Las muestras de agua se recolectaron en recipientes plásticos previamente esterilizados, se utilizaron dos recipientes para cada punto de muestreo. La recolección se realizó directamente de los grifos de abastecimiento de agua de los puntos mencionados, utilizando los parámetros descritos en las Normas INEN 1998.

2.3. Preparación de la muestra y cultivo inicial

Se tomaron 100 mL de agua potable recolectada y se filtraron en una rampa de succión usando filtros de membrana (CHM, MPV045047H, España), luego de la succión completa, se retiró cuidadosamente el papel de filtro y se colocó en placas de agar Rappaport (OXOID, CM0669, OK) específico para el crecimiento de enterobacterias. Se dejó incubar a 37°C durante 24 horas. Las colonias consideradas sospechosas se cultivaron en agar XLD (OXOID, CM0469, Reino Unido) bajo las mismas condiciones.

2.4. Confirmación microscópica

Las colonias con crecimiento considerable se analizaron mediante tinción de Gram. La identificación característica de *Salmonella* por tinción es un bacilo Gram negativo.

2.5. Análisis molecular

Cinco colonias de cada cepa cultivadas en agar TBX se suspendieron en 500 μ L de tampón TAE 1X y se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min a temperatura ambiente. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de purificación de ADN PureLink™ Microbiome (Invitrogen, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6. Ensayo de PCR y electroforesis

La PCR se realizó según el método establecido por Cheng et al. [5]. Para la electroforesis, 5 μ L de productos de amplificación fueron mezclados con 2 μ L de tampón de carga Blue/Orange 6X, charge dye (Promega, EE. UU) en geles de agarosa al 1,5% preparados con tampón TAE con 2 μ L de SYBR Safe DNA (Invitrogen, EE. UU.), Luego el gel fue expuesto a 100 V durante 40 min. Finalmente, los tamaños de las bandas se visualizaron con un transiluminador UV. Como controles positivos se utilizó ADN de la cepa de referencia *Salmonella arizonae* (ATCC 13314). Los aislados de *Salmonella* spp. se almacenaron en crioviales (Microbank™ Prolab Diagnostics, EE. UU) a -80 °C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico El aislamiento cultural de *Salmonella* mostró que 10 muestras de un total de 100 muestras tenían presencia de patógeno, con un total de 10 aislamientos (Tabla 2). Las colonias sospechosas mostraron un color típico de blanco a gris blanquecino, Gram negativas después de la tinción.

Tabla 2. Muestras detectadas con *Salmonella* mediante cultivo.

Área del muestreo de agua	N de muestra	N muestras positivas por cultivo (%)
Restaurantes	15	3 (20)
Centros educativos	25	3 (12)
Viviendas privadas	18	2 (11,1)
Lugares públicos	32	2 (6,25)
Vertientes principales y secundarias	10	0 (00)
Total	100	10

Luego del análisis, la mayor prevalencia de *Salmonella* se obtuvo en muestras de restaurantes con valores del 20% cada una, seguida de muestras obtenidas de escuelas y domicilios particulares con valores superiores al 10%, finalmente, la menor prevalencia con valores menores al 10% se detectó en lugares públicos, en las vertientes no se detectó contaminación.

Esto demuestra que la contaminación se da en el trasvase de agua, además, a pesar de que el tratamiento del agua de *Salmonella* se ha detectado en el agua de consumo final, esto probablemente se deba a que este patógeno puede sobrevivir en ambientes acuáticos a través de varios mecanismos, entre ellos entrar en el estado viable pero no cultivable (VBNC) y / o residir dentro de protozoos de vida libre [6]. Kovačić y col. [7], informó un brote de salmonelosis en

Šibenik, Croacia, que ocurrió en septiembre de 2014, el análisis microbiológico reveló que el brote fue causado por *Salmonella* enterica subsp. Enteritidis serovar entérico y se realizó con el agua subterránea de un manantial local. En otro estudio, Ekelozie et al. [8]. analizaron 220 muestras de agua en el estado de Anambra Nigeria, donde *Salmonella* fue más prevalente en el 35.0% de las muestras de agua del embalse examinadas, *S. typhi* fue la especie más prevalente, este resultado fue superior al obtenido en nuestro estudio. Además, Karkey et al. [9], detectaron ADN de *S. typhi* y *S. paratyphi* en 333 (77%) y 303 (70%) de 432 muestras de agua analizadas respectivamente, además, los autores descubrieron que la lluvia es un factor clave en esta contaminación fecal, que se correlaciona con los nitratos. Hernández-Domínguez et al. [10], donde de un total de 71 muestras de agua analizadas, solo el 4% fueron positivas para *Salmonella* spp. que se detectaron principalmente en muestras de agua no clorada.

3.1. Identificación de los aislados de *Salmonella* spp. por PCR

En la PCR para la detección de *Salmonella* spp, todos los aislados caracterizados previamente por cultivo y tinción de Gram mostraron la amplificación a una altura de banda característica de 262-pb (Figura 1), demostrando que los aislados obtenidos fueron positivos a pertenecer al género *Salmonella*, en un 10%. Un resultado parecido al nuestro fue informado por Shankar et al. [11], donde los investigadores analizaron mediante PCR 158 muestras de agua potable, obteniendo un valor de 17,72%. En otro trabajo desarrollado en Irán por Bonyadian et al. [12], de 240 muestras de agua embotellada, los resultados revelaron el gen IpaB de *Salmonella* sp con un 0,4% de las muestras positivas.

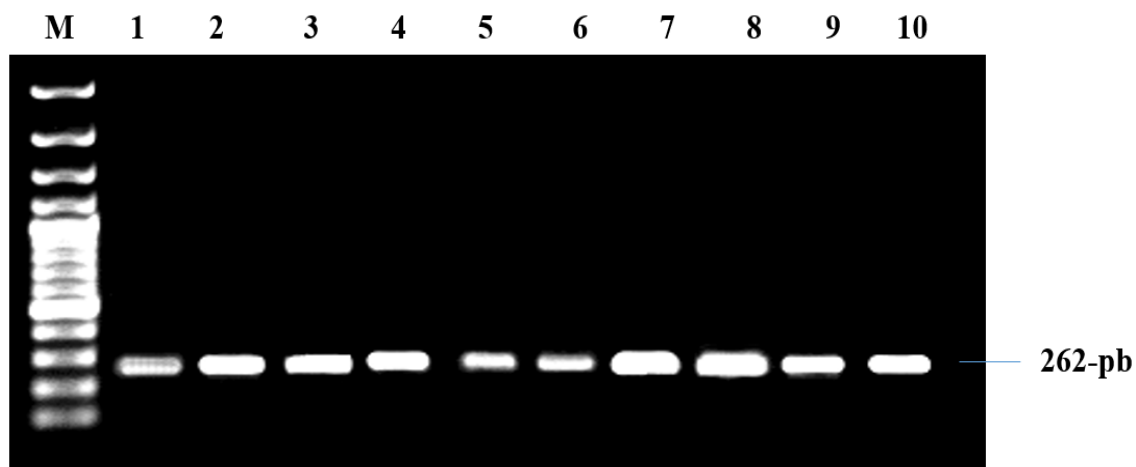


Figura 1. Electroforesis de la PCR convencional para la identificación de *Salmonella* spp. in muestras de agua de consumo humano: Carril M: Marcador de pesos moleculares, 100 pb, carriles 1-10: *Salmonella* spp.

4. CONCLUSIONES

Los niveles de detección de *Salmonella* son preocupantes considerando que la normativa exige la ausencia de patógenos en el agua para que pueda ser considerada apta para el consumo humano, lo que lleva a decisiones serias para evitar problemas de salud a la población.

AGRADECIMIENTOS: Este estudio fue apoyado por el Proyecto PIV-30-2018, del Departamento de Investigación y Vinculación, Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador; Además, gracias también al proyecto de canje de deuda Ecuador-España por haber proporcionado los equipos utilizados en este estudio.

REFERENCIAS

- [1] N. Paudyal, V. Anihouvi, J. Hounhouigan, M.I. Matsheka, B. Sekwati-Monang, W. Amoa-Awua, A. Atter, N. Ackah, S. Mbugua, A. Asagbra, W. Abdelgadir, J. Nakavuma, M. Jakobsen y W. Fan, “Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries a meta-analysis”. *International Journal of Food Microbiology*, 249, pp. 35–43, 2017.
- [2] F. Bayas-Morejón, A. Tigre, I. Aldaz, P. Parra, E. Ramos, R. Remache y C. Zamora, “Incidence of *Salmonella* spp. in Different Animal Species and Meat Products in Ecuador During the Period 2009-2019”, *J Pure Appl Microbiol*, vol. 13, no. 2, pp. 725-732, 2019. doi: 10.22207/JPAM.13.2.08
- [3] L.A. Andoh, S. Ahmed, J.E. Olsen, et al., “Prevalence and characterization of *Salmonella* among humans in Ghana”, *Trop Med Health*, vol. 45, no. 3, 2017. <https://doi.org/10.1186/s41182-017-0043-z>.
- [4] R.L.Lindsey, L. Garcia-Toledo, D. Fasulo, L.M. Gladney, y N. Strockbine, “Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*”, *J. Microbiol. Methods*, 140, pp. 1–4, 2017.
- [5] C.M. Cheng, W. Lin, K.T. Van, L. Phan, N.N. Tran, y D., Farmer, “Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR”, *J Food Prot.*, vol. 71, no. 12, pp. 2436-2441, 2008. doi:10.4315/0362-028x-71.12.2436
- [6] H. Liu, C. Whitehouse, y B. Li, “Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety”, *Front Public Health*, vol. 6, no. 159, 2018. doi: 10.3389/fpubh.2018.00159.
- [7] A. Kovačić, Z. Huljev, E. Sušić, “Ground water as the source of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis”, *Journal of Epidemiology and Global Health*, vol. 7, no. 3, pp. 181-184, 2017.
- [8] IS. Ekelozie, I. Ekejindu, O. Ochiabuto, M. Obi, U. Onwuasonya, y E., Obeagu, “Evaluation of *Salmonella* Species in Water Sources in Two Local Government Areas of Anambra State”, *Cohesive J. Microbiol infect Dis*, vol. 1, no. 1, *CJMI.000501*, 2018. DOI: 10.31031/CJMI.2018.01.000501.
- [9] A. Karkey, T. Jombart, A. Walker, C. Thompson, A. Torres, S. Dongol, N. Vu Thieu, D. Thanh, D. Thi Ngoc, P. Vinh, A. Singer, J. Parkhill, G. Thwaites, B. Basnyat, N. Ferguson, y S. Baker, “The Ecological Dynamics of Fecal Contamination and *Salmonella Typhi* and *Salmonella Paratyphi A* in Municipal Kathmandu Drinking Water”, *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 10, no. 1, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004346>.
- [10] C. Hernández-Domínguez, AM. Hernández-Anguiano, C. Cháidez-Quiroz, G. Rendón-Sánchez y T. Suslow, “Detección de *Salmonella* y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón "Cantaloupe"”, *Agricultura técnica en México*, vol. 34, no. 1, pp. 75-84, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jegh.2017.05.001>
- [11] P. Shankar, J. Mishra, V. Bharti, D. Parashar, y S. Singh, “Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *Giardia*

lamblia, and *Salmonella* spp. in the municipality-supplied drinking water”, *J Lab Physicians*, vol. 11, pp. 275-80, 2019.

- [12] M. Bonyadian, H. Moshtaghi, y H. Nadi, “PCR detection of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* sp. from bottled drinking water in Iran”, *J Infect Dev Ctries*, vol. 12, no. 9, pp. 700-705, 2018. doi: 10.3855/jidc.10160. PMID: 31999626.