



Nota Técnica

Aislamiento e identificación molecular de *Salmonella* spp., a partir de carnes de cerdo, res y pollo recolectadas de mercados en Guaranda

Isolation and molecular identification of *Salmonella* spp., from pork, beef and chicken meat collected from markets in Guaranda

Favian Bayas-Morejón ^{1*}, Sonia Salazar-Ramos ¹, Katherin Beltrán ¹, Luis Verdezoto ¹

¹ 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

Rec.: 22.07.2021 Acept.: 03.10.2021

Publicado el 30 de diciembre de 2021

*Correspondencia: fbayas@ueb.edu.ec

Abstract

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar la ocurrencia de *Salmonella* spp. en sesenta y una muestras de carne (19 de pollo, 22 de cerdo y 20 de res), recolectadas en los mercados centrales de Guaranda, provincia de Bolívar, Ecuador. Todas las muestras fueron analizadas por cultivo utilizando métodos específicos para el género de interés y los aislados obtenidos fueron confirmados mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Por cultivo, 25 muestras con 35 aislamientos resultaron positivos para *Salmonella* spp. Por PCR, 23 muestras (37.70%) fueron identificadas como *Salmonella* spp. La mayor tasa de prevalencia de *Salmonella* se detectó en la carne de cerdo, seguida de la carne de res. Este estudio destaca la importancia de este patógeno y la necesidad de realizar más estudios sobre su prevalencia y distribución en diferentes tipos de alimentos.

Palabras clave: *Salmonella* spp.; Caracterización, carnes

The objective of the study was to evaluate the occurrence of *Salmonella* spp. in sixty-one meat samples (19 chicken, 22 pork and 20 beef), collected in the central markets of Guaranda, province Bolivar. All samples were analyzed by culture using specific methods for the genus of interest and the isolates obtained were confirmed by PCR (Polymerase Chain Reaction). By culture, 25 samples with 35 isolates were positive for *Salmonella* spp. By PCR, 23 samples (37.70%) were identified as *Salmonella* spp. The highest prevalence rate of *Salmonella* was detected in pork, followed by beef. This study highlights the importance of this pathogen and the need for more studies on its prevalence and distribution in different types of food.

Keywords: *Salmonella* spp.; characterization; meats

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 (Paudyal *et al.*, 2017). Entre estos patógenos se encuentra el género *Salmonella* spp. (Bayas-Morejón *et al.*, 2019).

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 (Andoh *et al.*, 2017). 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 (Lindsey *et al.*, 2017).

El presente estudio fue diseñado para conocer la ocurrencia de *Salmonella* spp. en tres tipos de carnes en la ciudad de Guaranda mediante la utilización de métodos bacteriológicos y moleculares.

Materiales y métodos

Colección de muestra

Un total de 61 muestras de tres tipos de carnes (19 de pollo, 20 de res y 22 de cerdo) se recolectaron del mercado local de Guaranda de la provincia Bolívar (Ecuador). 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.

Preparación de muestras y aislamiento bacteriano

Para el aislamiento de *Salmonella* spp. se inocularon asépticamente 25 g de muestras (carne) en una proporción 1:10 en agua con peptona tamponada (BPW) (Oxoid, Reino Unido). La dilución se incubó durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se siguieron las directrices ISO 579: 2003 / A1 (2007). Para el aislamiento, se inocularon placas de agar XLD (Oxoid Ltd, Inglaterra) y se incubaron a 37 °C durante 24 h, luego su selección en agar TBX (Oxoid Ltd, Inglaterra). Todas las cepas seleccionadas se analizaron mediante tinción de Gram, para ensayos posteriores,

las cepas se almacenaron a -20 ° C.

Análisis molecular

Cinco colonias de cada cepa cultivadas en agar TBX se suspendieron en 500 µL de tampón TAE IX 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.

Ensayo de PCR y electroforesis

La PCR se realizó según el método establecido por Cheng *et al.* (2008). Para la electroforesis, 5µL de productos de amplificación fueron mezclados con 2 µL 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 µL 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).

Resultados y discusión

Aislamiento de bacterias mediante cultivo

En el aislamiento de *Salmonella* spp. por cultivo, 25/61 muestras tienen la presencia del patógeno, con un total de 35 aislamientos. La carne de cerdo mostró una mayor prevalencia del patógeno, seguida de la de res y pollo (Cuadro 1). Los resultados con valores de detección inferiores a los nuestros fueron obtenidos por Ahmed *et al.* (2014), 32 muestras (21.3%) resultaron positivas por cultivo para *Salmonella* spp. En otro estudio desarrollado por Shafini *et al.* (2017), un total de 86 (27.6%) muestras fueron positivas para *Salmonella* spp. Además, Ifeanyichukwu *et al.* (2016), obtuvieron un resultado mucho mayor que el nuestro, con una prevalencia de *Salmonella* spp. del 62% en productos avícolas. En Ecuador, existen pocos estudios relacionados con la detección y aislamiento de *Salmonella* spp. Así, tenemos el trabajo desarrollado por Vinuesa-Burgos *et al.* (2016), donde analizaron 388 lotes de pollos de engorde seleccionados aleatoriamente de Quito, obteniendo una prevalencia por cultivo de 16.0%.

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

En la PCR para la detección de *Salmonella* spp, 32 aislamientos (12 aislamientos / 10 muestras de cerdo; 11 aislamientos/7 muestras de res y 9 aislamientos/6 muestras de pollo) fueron positivos para *Salmonella*

Cuadro 1. Muestras detectadas de *Salmonella* spp. mediante cultivo y PCR

Tipo de muestra	Numero de muestra	Nº de muestras detectadas por cultivo	Nº de muestras detectadas por PCR
Pollo	19	6 (9.84%)	6 (9.84%)
Res	20	8 (13.11%)	7 (11.47%)
Cerdo	22	11 (18.03%)	10 (16.39%)
Total	61	25 (40.985)	23 (37.70)

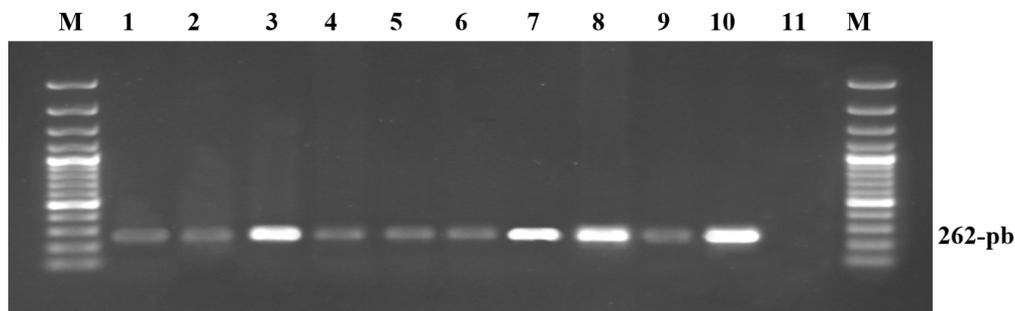


Figura 1. Electroforesis de la PCR convencional para la identificación de *Salmonella* spp. in muestras de carnes de pollo, res y cerdo, Calle M: Marcador de pesos moleculares, 100 pb, calles 1-3: *Salmonella* spp. en pollo, calles 4-6: *Salmonella* spp. En res, calles 7-9: *Salmonella* spp. en cerdo, calle 10: control positivo, calle 11: control negativo.

spp, (37.70%) (Cuadro 1); en los aislamientos positivos se obtuvo una banda característica de 262-pb (Figura 1). Trongjit *et al.* (2017) Obtuvieron resultados similares en Camboya, donde el 47% de las muestras de cerdo y pollo dieron positivo para *Salmonella* spp. por PCR. Por otro lado, Naik *et al.* (2015), obtuvo un valor de detección de *Salmonella* en la carne inferior al 10%.

Conclusión

Las diferencias en las tasas de prevalencia de *Salmonella* spp. en los diferentes tipos de carnes en este trabajo pueden atribuirse a múltiples factores, tales como variación geográfica y estacional, variaciones en los procedimientos de muestreo y prácticas de manejo animal; Además, nuestro trabajo es el único que ha enfocado su estudio en tres tipos de carne utilizando métodos moleculares y convencionales para la detección en Ecuador.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el Proyecto: Proyecto no. 12-2017 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.

Literatura citada

- Ahmed O, Asghar A, El-Rahimand I, Hegazy A (2014). Detection of *Salmonella* in Food Samples by Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. *J Bacteriol Parasitol* 5:1000187. doi:10.4172/2155-9597.1000187.
- Andoh L.A, Ahmed S, Olsen J.E. *et al.* (2017). Prevalence and characterization of *Salmonella* among humans in Ghana. *Trop Med Health* 45: 3. <https://doi.org/10.1186/s41182-017-0043-z>.
- Bayas-Morejón F, Tigre A, Aldaz I, Parra P, Ramos E, Remache R and Zamora C (2019). Incidence of *Salmonella* spp. in Different Animal Species and Meat Products in Ecuador During the Period 2009-2019. *J Pure Appl Microbiol* 13(2):725-732 doi: 10.22207/JPAM.13.2.08
- Cheng CM, Lin W, Van KT, Phan L, Tran NN, Farmer D. (2008). Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. *J Food Prot.*, 71(12):2436-2441. doi:10.4315/0362-028x-71.12.2436
- Ifeanyichukwu I, Chika E, Ogonna A, Chidinma I, Ajah M, Moses I, Stanley E, Nwakaeze E, Ngozi A, Agabus N (2016). Prevalence and antibiogram of *Salmonella* species isolated from poultry products in Ebonyi State, Nigeria. *Ifeanyichukwu et al. / J Adv Vet Anim. Res* 3(4): 353-359.

- ISO-6579 (2007). Microbiology – General Guidance on Methods for the Detection of *Salmonella*. 4th ed. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization.
- Lindsey, R.L., Garcia-Toledo, L., Fasulo, D., Gladney, L.M., Strockbine, N, (2017). Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *J. Microbiol. Methods* 140, 1–4.
- Naik V.K, Shakya S, Patyal A, Gade N.E (2015). Isolation and molecular characterization of *Salmonella* spp. from chevon and chicken meat collected from different districts of Chhattisgarh, India. *Vet World* 8:702. doi: 10.14202/vetworld.2015.702-706
- Paudyal N, Anihouvi V, Hounhouigan J, Matsheka M.I, Sekwati-Monang B, Amoa-Awua W, Atter A, Ackah N, Mbugua S, Asagbra A, Abdelgadir W, Nakavuma J, Jakobsen M, Fan W. (2017). Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries a meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology* 249:35–43.
- Shafini A, Son R, Mahyudin N, Rukayadi Y, Tuan Zainazor T, (2017), Prevalence of *Salmonella* spp. in chicken and beef from retail outlets in Malaysia. *International Food Research Journal* 24(1):437-449.
- Trongjit S, Angkititrakul S, Tuttle E, Pongseree J, Padungtod P, Chuanchuen R. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from broiler chickens, pigs and meat products in Thailand–Cambodia border provinces. *Microbiology and Immunology* 61(1):23-33. doi: 10.1111/1348-0421.12462
- Vinueza-Burgos C, Cevallos M, Ron-Garrido L, Bertrand S, De Zutter L. (2016). Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. *PLoS ONE* 11(7):e0159567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>