

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO SELADIS



**“IMPLEMENTACION DE UN NUEVO MÉTODO DE
DIAGNOSTICO PARA LA FIEBRE TIFOIDEA”**

POSTULANTE:

LENNY INGRID BACARREZA ALBA

ASESORA:

Dra. SUSANA REVOLLO ZEPITA

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN BIOQUIMICA**

LA PAZ – BOLIVIA

2005

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO SELADIS



**“IMPLEMENTACION DE UN NUEVO MÉTODO DE
DIAGNOSTICO PARA LA FIEBRE TIFOIDEA”**

POSTULANTE:

LENNY INGRID BACARREZA ALBA

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN BIOQUIMICA**

LA PAZ – BOLIVIA

2005

Dedicatoria:

**A mis queridos padres Víctor y Jenny
por brindarme la vida, el amor y la
confianza, en mi vida.....
Este trabajo es para ustedes
...Gracias !!!!**

AGRADECIMIENTOS

- ♣ Agradezco A Dios por darme la vida y permitirme dar esta alegría a mis padres.
- ♣ A mis padres por la paciencia, el las alegrías, los consejos y el cariño que me brindaron.
- ♣ A mi familia y mis hermanos Edison, Wilder, Lency, Poleth, Yúvica, a mis sobrinos queridos Gabriel, Michelle, Belén, Kevin, gracias por las alegrías que me dieron y por la colaboración brindada.
- ♣ Un agradecimiento especial a la Dra. Vesna Boric por sus enseñanzas, sus consejos, la ayuda prestada, y por su amistad gracias..
- ♣ A la Dra. Susana Revollo por la ayuda prestada, y por el asesoramiento de mi trabajo gracias Doctora.
- ♣ Al los miembros del Instituto SELADIS, por brindarnos los conocimientos adquiridos, y por permitir la realización de este trabajo.
- ♣ A mis queridas amigas Sarita, Raquel, Teresa, Paola, Renata, por el apoyo y colaboración brindada en todos esto años.
- ♣ A mis amigos Ronald y Marcos, gracias por la ayuda que me dieron.
- ♣ Un agradecimiento especial a Guido, gracias por la colaboración desinteresada que me diste y el apoyo que siempre me das.

RESUMEN

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa sistémica provocada por *Salmonella typhi*, la transmisión es a través de la comida contaminada, por portadores asintomáticos. Aún cuando la incidencia de la fiebre tifoidea tiende a disminuir, se ha estimado que anualmente se presentan 16,6 millones de casos de fiebre tifoidea, y aproximadamente 600.000 muertes en el mundo.

En Bolivia aun se presentan casos de esta enfermedad, es así, que en el 2003 se presentaron 699 casos de Fiebre tifoidea en el Departamento de Beni, 187 casos en Tarija, 147 casos en Chuquisaca, siendo estos departamentos los que presentaron la mayor prevalencia de la enfermedad en Bolivia.

Salmonella typhi es una enterobacteria que, puede causar mayores patologías en el hombre, esta una de las más importantes de su género, y es el único serovar conocido que infecta exclusivamente al hombre, produciendo fiebre tifoidea.

En la actualidad la identificación de *Salmonella typhi* es realizada, por métodos de diagnóstico convencionales como, Reacción de Widal, Coprocultivo, Hemocultivo, etc. que en la mayoría de los casos se realizan pasados los síntomas clínicos, poniendo en riesgo al paciente de sufrir complicaciones clínicas y convirtiendo a los pacientes en portadores asintomáticos.

La implementación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ayudan a la realización de un diagnóstico rápido y de alta sensibilidad, en una fase temprana de la enfermedad.

En esta investigación, se optimizó la prueba de Nested-PCR, para la identificación de *Salmonella typhi* en sangre periférica. Los resultados obtenidos demuestran que esta técnica es muy sensible ya que detecto la presencia del ADN de la bacteria en estudio, en mínimas concentraciones, obteniendo un límite de detectabilidad de la técnica de 1 bacteria en 5 ml de sangre periférica.

Además se determinó que la técnica de Nested-PCR es altamente específica ya que identifica exclusivamente el ADN de *Salmonella typhi*, a diferencia de otras técnica de diagnóstico convencional, que pueden tener reacciones cruzadas no específicas para la enfermedad. Por los resultados obtenidos en este estudio, se podría recomendar el uso de esta técnica para el diagnóstico de Fiebre tifoidea en una fase temprana de la enfermedad.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
A. DATOS GENERALES	5
B. DATOS EPIDEMIOLOGICOS	6
C. CARACTERISTICAS GENERALES DEL MICROORGANISMO	7
D. CLASIFICACIÓN	8
E. MANIFESTACIONES CLINICAS	10
F. FIEBRES ENTERICAS	10
1. Curso de la enfermedad	11
a. Incubación	12
b. Etapa Invasora	12
c. Periodo de estado	13
d. Evolución.....	14
G. MECANISMOS DE INTERACCION DE SALMONELLA CON LA MUCOSA INTESTINAL	15
1. Adhesión.....	17
2. Patogénesis	17
3. Invasión de la Mucosa	18
4. Sistema de secreción	19
5. Proteínas Reguladoras	21
6. Origen Genético de la Islas de Patogenicidad	22
7. Islas de Patogenicidad.....	23
H. BASES MOLECULARES DE <i>Salmonella typhi</i>	26
1. Taxonomía Molecular	26
2. Organización del Genoma	29
3. Sistema PHOP/PHOQ	30
4. Otros Locis de Patogenicidad	31

I. CARACTERISTICAS DEL GENOMA DE <i>Salmonella typhi</i>	31
J. IDENTIFICACION DE LA BACTERIA PRUEBAS BIOQUIMICAS	33
1. Agar Triple azúcar Hierro	33
2. Agar Lisina descarboxilasa	32
3. Medio Sulfuro Indol Motilidad	32
4. Producción de Ureasa	34
5. Prueba de Citrato	34
K. NESTED PCR	35
L. CUANTIFICACION POR ESPECTROFOTOMETRIA	36
M. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	37
1. Hemocultivo	37
2. Mielocultivo	37
3. Coprocultivo	37
4. Cultivo de Bilis duodenal	38
5. Urocultivo	38
N. DIAGNOSTICO SEROLOGICO	38
O. TRATAMIENTO	39
1. Tratamiento Específico	39
2. Medidas generales	40
P. TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES	41
III. OBJETIVOS	43
A. OBJETIVO GENERAL	43
B. OBJETIVOS ESPECÍFICO	43
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL	44
1. Primera parte	44
2. segunda parte	44
A. CEPA	45
B. PRUEBAS BIOQUIMICAS	45
C. PREPARACION DE LAS DILUCIONES	45

D. MUESTRAS	45
E. DETERMINACION DE LA POBLACION BACTERIANA POR RECuento EN PLACA	46
F. CONTAMINACIÓN EN SANGRE PERIFERICA	46
G. EXTRACCION DE ADN DE <i>Salmonella typhi</i> A PARTIR DE CULTIVO.....	46
1. Variante A.	47
2. variante B.....	47
3. Variante C	47
I. CUANTIFICACION DE ADN DE <i>Salmonella typhi</i> POR ESPECTROFOTOMETRIA	48
J. REALIZACIÓN DEL NESTED-PCR PARA <i>Salmonella typhi</i>	46
1. Preparación de la mezcla principal de reactivos.	46
2. Siembra de las muestras obtenidas	49
3. Amplificación de las muestras	49
4. Revelado de las muestras	50
5. Realización de la extracción de ADN de <i>Salmonella typhi</i> a partir de sangre periférica	51
5.1 Ensayo 1	51
5.2 Ensayo 2	52
5.3 Ensayo 3	53
5.4 Ensayo 4	53
K. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella typhi</i>	54
1. Obtención de la cepa control	54
2. Siembra de la cepa control en medios de cultivo selectivos	54
3. Pruebas bioquímicas	54
V. RESULTADOS Y DISCUSION	55
A. CULTIVO.....	55
1. Cepa de Referencia	55

2. Recuento del número de bacterias en las diluciones	55
B. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN	57
1. Extracción de la cepa de referencia	57
2. Extracción de ADN de <i>Salmonella typhi</i> en muestras a partir de sangre periférica humana	58
3. Cuantificación de ADN de <i>Salmonella typhi</i> por espectrofotometría	59
C. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE NESTED-PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Salmonella typhi</i>	62
1. Obtención de ADN extraído de la cepa control de <i>Salmonella typhi</i>	62
2. Obtención del ADN de <i>Salmonella typhi</i> extraído de sangre periférica	63
VI. CONCLUSIONES	67
VII. RECOMENDACIONES	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71

TABLAS

TABLA 1. Informe anual de laboratorio de casos de fiebre tifoidea en el año 2003	6
TABLA 2. Clasificación del género <i>Salmonella</i>	9
TABLA 3. Secuencia de los Cebadores BRSal A, BRSal B.	46
TABLA 4. Secuencia de los Cebadores BRSal 1A, BRSal 1B.	47
TABLA 5. Protocolo para la realización de la Mezcla de reactivos para la primera y segunda etapa	47
TABLA 6. Temperatura y tiempo de reacciones de los Cebadores BRSal IA, BRSal IB.	48
TABLA 7. Temperatura y tiempo de reacciones de los Cebadores BRSal 1A, BRSal 1B.	49
TABLA 8. Determinaciones de las diluciones iniciales en relación a la correspondiente dilución.	55
TABLA 9. Relación del Número de colonias en cada una de las diluciones obtenidas en el recuento de PCA	56
TABLA 10. Lectura de las absorbancias en la primera Extracción a partir de sangre periférica.	60
TABLA 11. Determinación de las Absorbancias en la segunda Extracción de ADN de <i>Salmonella typhi</i>	61
TABLA 12. Resultado de las muestras en relación a las diluciones realizadas y a la población bacteriana en 1 mL de las diluciones.	66

FIGURAS

FIGURA 1. Figura de <i>Salmonella typhi</i>	7
FIGURA 2. Evolución clínica de la Fiebre Tifoidea	12
FIGURA 3. Frecuencia de signos y síntomas de pacientes con fiebre tifoidea.....	13

FOTOGRAFIAS

- FOTO 1.** Fotografía de los controles positivos obtenidos de cepas puras de *Salmonella typhi*..... 63
- FOTO 2.** Fotografía de las muestras de sangre periférica contaminadas con *Salmonella typhi* en sangre periférica 64
- FOTO 3.** Fotografía de las muestras obtenidas de la extracción de ADN de *Salmonella typhi* en muestras de sangre periférica purificadas con etanol. 65

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

La diversidad de infecciones entéricas en nuestro país nos permite paulatinamente la implementación de nuevos métodos para el diagnóstico de las mismas. Estas infecciones son causadas en su mayoría, por parásitos y bacterias entéricas. Por ejemplo, *Salmonella typhi*, causa la Fiebre tifoidea, entre los síntomas que se observan en el transcurso de esta enfermedad tenemos cefalea, delirio, tos, diarrea acPuosa, o estreñimiento, erupción cutánea y fiebre recurrente.

La transmisión de esta bacteria puede presentarse a causa del consumo de alimentos contaminados o mal manipulados como por ejemplo, la leche, agua, alimentos, verduras, frutas, inclusive hasta por la cáscara de huevo, es posible la transmisión ocasional por contacto directo (vía anal-oral) que generalmente se dan en niños durante el juego y en adultos durante las relaciones sexuales entre portadores asintomáticos, eliminan al microorganismo a través de la defecación, el microorganismo se aloja en la vesícula biliar quedando en el organismo durante mucho tiempo sin producir enfermedad pero con la posibilidad de contagiar. "Entre las complicaciones que puede producir están la hemorragia o perforación intestinal, la tromboflebitis, colecistitis, hepatitis o infección a larga distancia del intestino, e inclusive en una mayor gravedad puede ser mortal" (1).

El jugo gástrico puede eliminar la cantidad de bacterias consumidas por alimentos contaminados, pero, el consumo de agua, diluye el jugo gástrico, ayudando aun más a la ingesta y propagación de la bacteria causando infección y malestares.

Algunos autores indican que la dosis infectante de *Salmonella typhi*, es de 10^6 UFC/ml, y otro indican que la dosis infectante es de 10^9 UFC/ml, para causar la enfermedad, pero hay que tener en cuenta que esta variación depende en su mayoría del estado inmunológico en el que se encuentra el paciente, es decir, que el cuerpo elimina bacterias cuando se encuentran en mínimas cantidades que no podrían causar ningún tipo de infección, en caso de que el sistema inmunológico no este débil, por el contrario en una persona inmunodeprimida, no tendrá las suficientes defensas para depurar a las bacterias agresoras, causando fácilmente la enfermedad.

Para la realización del diagnóstico, el médico generalmente pide la Reacción de seroaglutinación, conocida como Prueba de Widal, por ser esta una técnica rápida pero no precisa, esta prueba consiste en la observación microscópica de aglutinación de anticuerpos, formados por la exposición a alguna enterobacteria, tiene poco valor como prueba diagnóstica, ya que la misma no determinara al microorganismo causante de la enfermedad solamente muestra un título elevado de aglutininas contra el antígeno "O" o el antígeno "H". La identificación de los anticuerpos formados en caso de fiebre tifoidea, se presentan recién a partir de la tercera a cuarta semana de exposición a la bacteria. "En muchos de los casos de fiebre tifoidea no se encuentra elevación de los títulos durante el curso de la enfermedad, muchas veces las elevaciones de los títulos de aglutininas son la causa de reacciones cruzadas" (2).

Otra de las pruebas que se utilizan para el diagnóstico es, el Coprocultivo esta prueba consiste en el cultivo de la muestra de heces fecales en medios enriquecidos específicos para *Salmonella typhi*, esta crecerá con la

característica del “ojo de pescado”, posteriormente se realizan pruebas bioquímicas para la identificación de Salmonelas, dando una batería característica de la bacteria. Se deberá realizar el antibiograma para la determinación del tratamiento que deba seguir el paciente. El riesgo que se corre en esta prueba es la contaminación con otras bacterias con la misma característica de crecimiento que *Salmonella typhi*, además el tiempo de duración de la prueba es de 48 horas. “Los diagnósticos positivos de fiebre tifoidea se observan a la tercera semana de exposición a la bacteria, esta prueba es útil para control postratamiento para detectar portadores crónicos” (2).

Otra de las pruebas que se utiliza es el “Hemocultivo, es el procedimiento de elección, cuando se realiza apropiadamente en medios selectivos a base de bilis, coincidiendo con la fisiopatología de la infección, son positivos en la primera semana de la infección, pero va rebajando el porcentaje de confiabilidad en un 50% en la tercera semana” (2).

“La toma de muestra será cuando el paciente se encuentre cursando los picos febriles de la enfermedad, ya que es en esta etapa invasora, donde se encuentran circulando las bacterias en la sangre periférica causando los síntomas de la enfermedad” (3), la desventaja de esta prueba es el tiempo que tarda en la obtención de la resultados positivos, ya que el tiempo de incubación es de siete días aproximadamente, observando, la presencia de turbidez en el medio en que se tomo la muestra.

Haciendo una comparación de las técnicas utilizadas tradicionalmente, y tomando en cuenta la gravedad que podría tomar la enfermedad, se podría concluir que son técnicas no muy específicas, algunas tienen mucho tiempo de duración para la identificación final del patógeno, por

ello se ve la necesidad de implementar nuevos métodos de diagnóstico que sean mucho más rápidos y precisos como las técnicas moleculares que son mucho más sensibles, exactas, confiables y sobre todo se pueden realizar en ocho horas desde la extracción de ADN.

La técnica de PCR, permite ampliar millones de veces un fragmento de material genético, está llamado a revolucionar la práctica clínica actual permitiendo el diagnóstico precoz de las patologías causadas por agentes infecciosos entre otros.

El presente trabajo pretende realizar el estudio acerca de una alternativa para un diagnóstico rápido y sensible para la detección molecular *Salmonella typhi* a través de técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidado (Nested-PCR), para este cometido se realizó la optimización de la técnica de extracción del DNA de la bacteria en sangre periférica y posteriormente la realización del Nested-PCR.

La utilización de esta técnica, Nested-PCR, nos ayudará a detectar la presencia de *Salmonella typhi*, ya que se comprobó, en trabajos de investigación realizados anteriormente, en huevos y en muestras fecales, que esta técnica es mucho más efectiva y sensible ya que determina la existencia de un gen específico de la bacteria infectante.

El propósito del presente trabajo es la detección precoz de fiebre tifoidea por la técnica de Nested-PCR que utiliza cebadores específicos para la detección del microorganismo. La gran ventaja con esta técnica es que la detección de los patógenos se la puede realizar en un día con un diagnóstico preciso, confiable, y exacto.

ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

A. DATOS GENERALES

El género *Salmonella* comprende más de 2.200 serovares distintos, algunos de los cuales pueden infectar un amplio rango de hospedero. *Salmonella enteritidis*, por ejemplo, es capaz de infectar un gran número de aves y mamíferos, incluyendo el hombre, causando una variedad de síntomas dependiendo del hospedero. Otros, en cambio, son altamente adaptados a un hospedero específico, como es el caso de *Salmonella gallinarum* que infecta sólo a aves, o *Salmonella typhi*, que es el único serovar conocido que infecta exclusivamente al hombre, produciendo la fiebre tifoidea. (4)

Aún cuando la incidencia de la fiebre tifoidea tiende a disminuir, se ha estimado que anualmente se presentan 16,6 millones de casos de fiebre tifoidea, y aproximadamente 600.000 muertes en el mundo. Conociendo la real dimensión del problema de salud pública que representa esta enfermedad, en general, en los países en vías de desarrollo, se hace imprescindible implementar nuevas estrategias de prevención y control. Estas estrategias deben estar dirigidas a mejorar las condiciones sanitarias y tratamientos de agua y por otra parte a desarrollar vacunas con mayor eficacia que las diseñadas hasta ahora. Por esta razón, es necesario estudiar las bases moleculares de los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella typhi*, cuya comprensión permitirá abordar el problema desde nuevas perspectivas. (5)

B. DATOS EPIDEMIOLOGICOS EN BOLIVIA

El Ministerio de Salud y Previsión Social, juntamente con sus instituciones el Servicio Departamental de Salud (SEDES), y el Sistema Nacional de Información en Salud (SNIS), mostraron en su informe anual los casos reportados de Fiebre tifoidea en el año 2003, estableciendo que el departamento de Beni reporta una mayor incidencia de casos de fiebre tifoidea, seguido por el departamento de Tarija y Chuquisaca, siendo el departamento de La Paz el que reporto una ausencia total de los casos.

Según las estadísticas que se obtuvieron del SEDES, determina que de un total de 2.009 muestras con sospecha de fiebre tifoidea 1.152 dieron positivas.

A continuación se detalla los resultados obtenidos en el año 2003. (6)

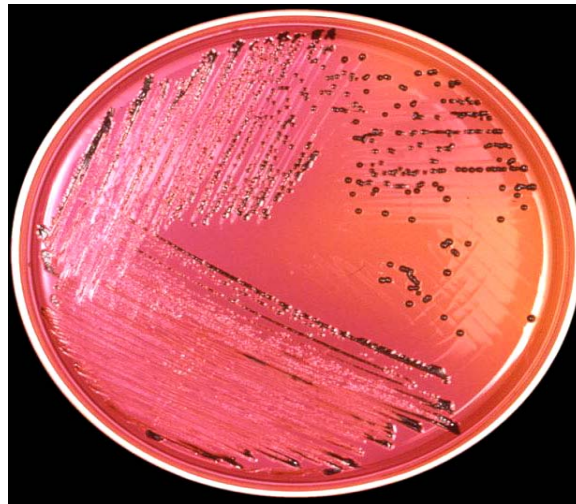
Tabla 1 Informe anual de Laboratorio de casos de Fiebre tifoidea en el año 2003 de algunos departamentos de Bolivia.

Depto	EN EL SERVICIO		REFERIDAS DE OTROS LABORATORIOS		TOTAL DE MUESTRAS	TOTAL DE MUESTRAS PROCESADAS	TOTAL DE POSITIVOS
	MUESTRAS OBTENIDAS	MUESTRAS PROCESADAS	MUESTRAS RECIBIDAS	MUESTRAS PROCESADAS			
BENI	899	874	0	0	899	874	699
CHUQUISACA	334	334	0	0	334	334	147
COCHABAMBA	24	24	0	0	24	24	1
LA PAZ	11	0	0	0	11	0	0
ORURO	48	39	0	0	48	39	8
POTOSI	134	134	47	47	181	181	110
TARIJA	512	501	0	0	512	501	187
TOTAL	1,962	1,906	47	47	2,009	1,953	1,152.00

Datos recopilados del informe de Laboratorio del SEDES (6)

C. CARACTERISTICAS GENERALES DEL MICROORGANISMO.

Las salmonellas son bacterias gram-negativas, lo cual significa que no se tiñen de azul con el colorante aplicado en la prueba diseñada por Gram. Esto se debe a que dicho colorante tiñe la pared celular, que en estos casos está cubierta por una membrana externa. Es así que estas bacterias están envueltas por varias capas: la membrana externa, la pared celular (que es diez veces más delgada que en las bacterias gram-positivas), y la membrana interna. La membrana externa e interna delimita al periplasma. La apariencia de las bacterias en el microscopio es de bacilos, o cilindros con puntas redondeadas. (4)



Fuente: Biblioteca de consulta encarta 2003.

Figura 1. Fotografía de *Salmonella typhi* causante de fiebre tifoidea (7).

El género *Salmonella* fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith, recibiendo el nombre por su jefe David Salmon. Las salmonellas son bacterias entéricas, o sea que se alojan en el intestino, y su taxonomía es compleja.

Actualmente, el género *Salmonella* consiste de una sola especie, que ha sido denominada *Salmonella enterica*. Cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovares, de acuerdo al tipo de antígeno H (flagelar: del alemán *hauch*, "por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento") u O (somático: del alemán *ohne hauch*, "sin movimiento"). El antígeno H está conformado por la proteína más abundante del flagelo, que es la estructura que permite el movimiento. (4)

El antígeno O está conformado por una cadena repetida de polisacáridos, que forma parte del lipopolisacárido (LPS), que se genera y sobresale de la membrana externa y que actúa como una barrera de protección a agentes externos. (4)

Aunque la mayoría de los serotipos de *Salmonella* no pueden ser distinguidos por reacciones bioquímicas, *Salmonella typhi*, posee algunas características bioquímicas únicas que le permite ser diferenciado de otros. (8)

D. CLASIFICACION

Las Salmonellas son el grupo más complejo de *Enterobacteriaceae* con más de 2.200 serotipos descritos en el esquema de Kauffman-White. En este esquema las salmonelas se agrupan sobre la base del antígeno somático O y se subdividen en serotipos por su antígeno flagelar H como se muestra a continuación: (8)

Tabla 2. Clasificación del Género Salmonella. (8)

<u>SEROTIPOS DE <i>Salmonella</i></u>	<u>SEROGRUPO</u>
Subgrupo 1 incluye la mayoría de los serogrupos.	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella gallinarum</i> <i>Salmonella pullorum</i>
Subgrupo 2	<i>Salmonella salamae</i>
Subgrupo 3a	<i>Salmonella arizonae</i>
Subgrupo 3b	<i>Salmonella diarizonae</i>
Subgrupo 4	<i>Salmonella houtenae</i>
Subgrupo 5	<i>Salmonella bongori</i>
Subgrupo 6	<i>Salmonella choleraesuis</i> subesp. <i>Índica</i> .

Fuente: KONEMAN "Diagnostico microbiológico" 2001

Estos bacilos no producen esporas. La mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos, que rodean a la célula. Interesantemente, existen cepas no móviles en Indonesia, en donde la incidencia de la fiebre tifoidea es más alta. (2)

Salmonella typhi produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol, sin la producción de gas; pero no fermenta la lactosa, sacarosa, la ramnosa y otros azúcares. Produce nitrito a partir de nitrato y también produce ácido sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37oC. (2)

De modo adicional, cepas de *Salmonella typhi* que son bioquímicamente menos activas que los serotipos más comunes y específicamente negativas en las siguientes reacciones: Citrato de Simmons, ornitina descarboxilasa; producción de gas a partir de glucosa, fermentación de dulcitol, la arabinosa y la ramnosa; utilización de mucato y acetato. (8)

E. MANIFESTACIONES CLINICAS

Las manifestaciones clínicas de las salmonelosis se presentan básicamente bajo tres modalidades: las denominadas fiebres entéricas entre las cuales la más común es la fiebre tifoidea producida por la *Salmonella typhi*; las gastroenteritis producidas por varios tipos, entre ellas la *Salmonella typhimurium*; y la forma septicémica, caracterizada por la bacteremia asociada a lesiones focales debida frecuentemente a la *Salmonella choleraesuis*. (2)

Dentro de las manifestaciones clínicas comunes está la fiebre acompañada de dolor abdominal, evacuaciones intestinales frecuentes, líquidas, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre. Estos cuadros clínicos son más severos en los niños y en los viejos. En niños desnutridos puede observarse la diseminación hematógica dando lugar a bacteremias con compromiso de otros órganos tales como las meninges, el oído, los pulmones, los riñones y el hueso. (2)

F. FIEBRES ENTERICAS (FIEBRE TIFOIDEA)

Es clásico dividir las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea de acuerdo a su evolución en semanas o septenarios. Se sabe que la *Salmonella* tiene un período de incubación que se calcula en aproximadamente 10 días. (2)

1. Curso de la enfermedad

La fiebre entérica es una enfermedad aguda, siendo la fiebre intermitente una de las primeras manifestaciones clínicas. Sin embargo, esta enfermedad presenta a menudo síntomas clínicos atípicos que complican el diagnóstico y dificultan el tratamiento.

La severidad de una infección por *Salmonella typhi* puede variar enormemente dependiendo del número de microorganismos ingeridos. Algunos pacientes expuestos a pequeñas cantidades de bacteria no muestran síntomas o signos de la enfermedad. En el otro extremo, la enfermedad puede llegar a ser mortal. Las características clínicas son variables y relativamente inespecíficas. Los síntomas llamados clásicos de la enfermedad sólo se observan en aproximadamente un 50% de los casos.

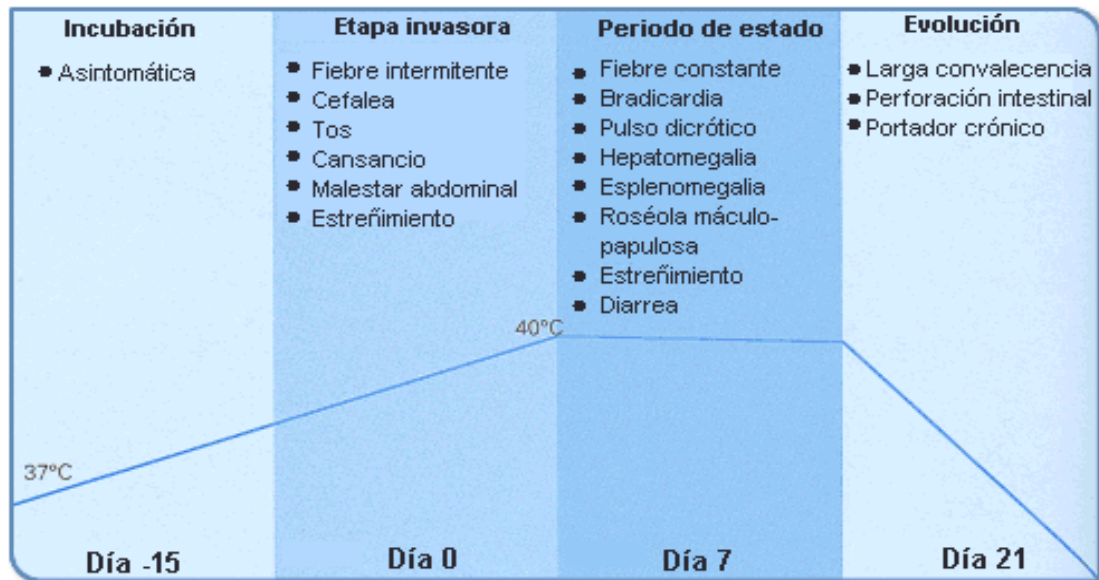
(3)

Típicamente, la fiebre tifoidea pasa a través de las siguientes 4 etapas:

- a. Incubación
- b. Fase de invasión
- c. Periodo de estado
- d. Evolución

En el siguiente cuadro se observa la evolución por la que cursa el paciente infectado con Fiebre tifoidea.

Figura 2 - Evolución clínica de la fiebre tifoidea (3)



Fuente: World Wide vaccines.com

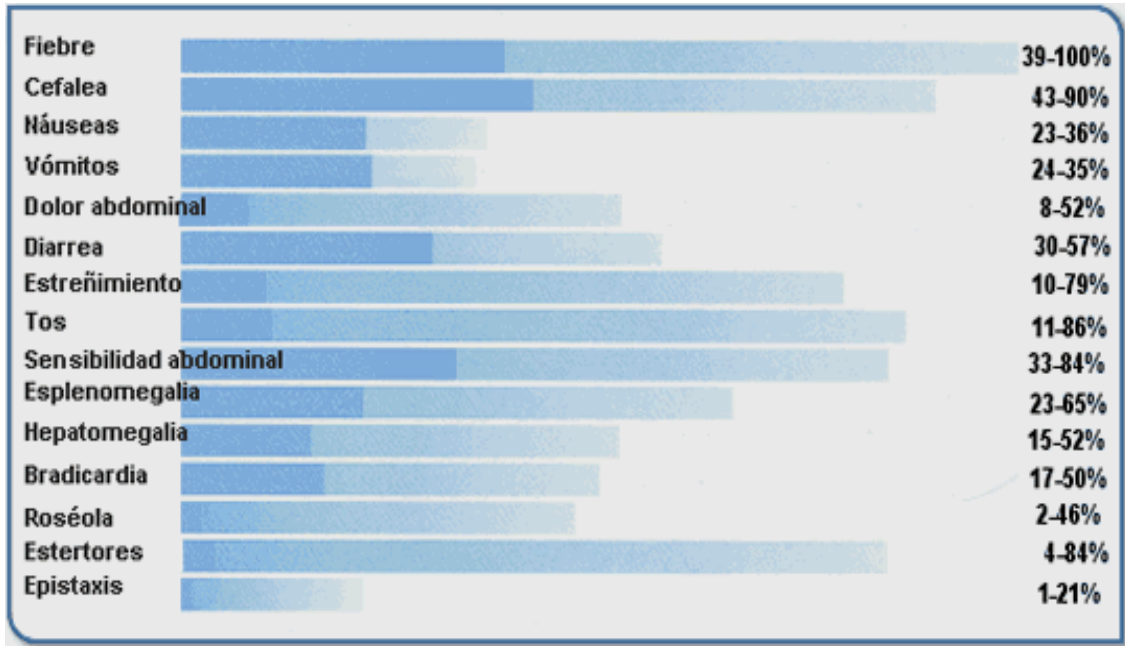
a. Incubación

El tiempo desde la ingestión de *Salmonella typhi* hasta la aparición de los primeros síntomas por lo general es de 1–2 semanas aproximadamente. Sin embargo, puede ser tan corto como 3 días o tan largo como 2 meses, dependiendo de la dosis infectante ingerida. (3)

b. Etapa invasora

Los primeros signos y síntomas son generalmente una fiebre intermitente elevada acompañada de cefalea persistente, tos no productiva, cansancio, insomnio, pérdida de apetito y malestar abdominal asociado con frecuencia con estreñimiento (3) Figura 3

Figura 3. Frecuencia de signos y síntomas de pacientes con fiebre tifoidea. (3)



Fuente: World wide vaccines.com

c. Periodo de estado

Aproximadamente una semana más tarde el paciente desarrolla una fiebre continua. El ritmo cardiaco es más lento (bradicardia) y el pulso puede tener un doble latido (pulso dicrótico). Puede detectarse un hígado agrandado (hepatomegalia) o un bazo inflamado (esplenomegalia). La hepatomegalia puede documentarse en un 33% de los casos y en una tercera parte de estos pacientes se encontrará ictericia. Los síntomas respiratorios pueden predominar en los primeros días de la fiebre tifoidea y ocasionalmente puede documentarse neumonía en parches. En algunos pacientes la enfermedad semeja un proceso pulmonar primario. Los pacientes se quejan con frecuencia de malestar abdominal incluyendo estreñimiento, diarrea, dolor abdominal, sensibilidad del íleo o abdomen.

Un hallazgo frecuente en la fiebre tifoidea aguda es íleo segmentado en donde pueden apreciarse asas dilatadas del intestino delgado cuando se palpa el abdomen debido a que el aire y el líquido se desplazan al tocarlo con los dedos. La roséola tífica (pápulas rosas de aproximadamente de 2-4 mm de diámetro que desaparecen con la presión) aparece en el tronco de los pacientes caucásicos hasta en un 50% de los casos. Es común el dolor abdominal, estreñimiento y/o diarrea. La faringe está seca y roja, y algunas ocasiones puede observarse una "lengua aframbuesada".

A medida que la enfermedad avanza, la fiebre alta persiste y el paciente se debilita, se siente confuso, respira rápidamente y tiene un pulso débil. El abdomen se encuentra distendido y se desarrolla diarrea a menudo conocida como "jugo de melón" o "sopa de chícharo". (3)

d. Evolución

Los pacientes no tratados comienzan a mejorar por lo general 4 semanas después de la aparición de la enfermedad. La fiebre disminuye lentamente a lo largo de 2-3 semanas y pueden persistir los trastornos gastrointestinales. La recuperación completa puede requerir hasta 3-4 meses. Los pacientes tratados con antibióticos apropiados responden con una reducción gradual de la fiebre en un periodo de 3-5 días. (3)

En un 5-12% de casos la enfermedad es recurrente; antes de la aparición de las quinolonas las recurrencias eran un poco más frecuentes (10-20%) después de la antibioterapia. Por lo general, la recaída ocurre aproximadamente 1 semana después de suspender el tratamiento, pero se ha observado que puede presentarse 70 días más tarde.

La severidad de la recaída está inversamente correlacionada con la severidad de la enfermedad primaria, pero usualmente la recaída es más leve y más corta que la enfermedad inicial. En raras ocasiones puede ocurrir una segunda y tercera recaídas.

En un 2-5% de los casos el paciente se convierte en portador crónico a pesar del tratamiento con antibióticos. Los portadores crónicos están predispuestos a cáncer de vías biliares, también colorrectal, de páncreas, de pulmón y otros. (3)

Las complicaciones pueden presentarse en cualquier órgano, sin embargo las más severas y más temidas son la hemorragia digestiva y la perforación intestinal. Otras complicaciones de las salmonelosis son los aneurismas micóticos los cuales han sido descritos a nivel de la aorta abdominal, las arterias poplíteas, iliaca y carótida. Esta condición requiere un diagnóstico temprano y de tratamiento médico y quirúrgico debido al riesgo de hemorragias cataclísmicas. (2)

G. MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE SALMONELLA CON LA MUCOSA INTESTINAL

Salmonella es una de las bacterias patógenas más ampliamente estudiada en cuanto a su fisiología, genética, estructura celular y patogénesis, principalmente el serotipo *Typhimurium*, debido a su fácil manejo en el laboratorio, posibilidad de manipulación con técnicas moleculares y por tener un modelo animal como es el ratón, que permite realizar experimentos in vivo. (9)

Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y seguidamente coloniza el intestino delgado, logrando entrar en las células epiteliales, sus células blanco, en un fenómeno de invasión mediado por un rizamiento o encrespamiento (ruffling), de membrana de la célula epitelial; esta interacción de Salmonella y las células hospederas es íntima y compleja, explotando así la bacteria las funciones celulares preexistentes del hospedero para su propio beneficio. (9)

Entre las Salmonelosis encontradas en países en desarrollo está la fiebre tifoidea producida por Salmonella enterica serovar Typhi y Paratyphi, la cual es una infección severa que puede producir complicaciones y muerte. Las primeras descripciones acerca de Salmonella se remontan a finales del siglo XIX , cuando fue llamada así por el patólogo Salmon quien la aisló de intestinos porcinos y la utilizó para vacunas; fue cultivada por Gaffky en 1884. (9)

En la mayoría de los casos, la enfermedad no es el resultado del daño de tejido causado por la infección bacteriana, sino por la reacción del hospedero a los potentes factores pro inflamatorios liberados por la bacteria, como es el caso de la diarrea inflamatoria inducida por la liberación de los gránulos de los neutrófilos, que posterior a la invasión de la mucosa son atraídos por el quimioatrayente epitelial estimulado por patógenos (PEEC) y la producción por parte de las células de la mucosa de citoquinas proinflamatorias como la interleukina (IL8). (9)

1. ADHESIÓN

Antes de invadir cualquier tipo de célula, la bacteria debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili, cuatro de los cuales están definidos genéticamente: fimbria tipo 1 (fim), fimbria codificada por plásmidos (pef), fimbria polar larga (lpf) y fimbria agregativa delgada (Curli) (agf/csg). (9)

La presencia de por lo menos estos cuatro sistemas fimbriales sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en la supervivencia de Salmonella en el medio ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad. (9)

2. PATOGÉNESIS

Aunque la exposición a Salmonella es frecuente, se requiere de un inóculo de aproximadamente 10^6 – 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática; otros factores como el tipo de cepa, qué alimento es consumido con la bacteria y el estado fisiológico del hospedero, también favorecen o no el desarrollo de la enfermedad. Salmonella debe pasar barreras y manipular las células del hospedero en sitios específicos a lo largo de curso de la infección. Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y seguidamente coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales y migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfóide presentándose hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. (9)

Los polimorfonucleares neutrófilos son estimulados y la infección se limita, en el caso de enteritis, a nivel del tracto gastrointestinal. Si son serotipos productores de fiebre entérica no son retenidas a este nivel sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática. (9)

Salmonella establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal, antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado rizamiento o encrespamiento, (ruffling).

Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reorganizar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que en últimas causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado invasión. (9)

Estudios realizados en ratones para observar la invasión de Salmonella serotipos typhi y typhimurium demostraron que solo invadían las células M. No es claro por qué se observó este fenómeno en ratones y no en otros modelos animales. (9)

3. INVASIÓN DE LA MUCOSA

Varios estudios han mostrado que la Salmonella preferencialmente se une e invade las células en la placa de Peyer del intestino delgado en ratones infectados oralmente, sin embargo las bacterias pueden también ser encontradas en enterocitos no fagocíticos. Las interacciones entre especies de Salmonella y células hospederas son íntimas y complejas.

Esta bacteria es hábil en explotar las funciones celulares pre existente del hospedero y usar estas funciones para su propio beneficio. Esto se ha visto durante la invasión, cuando Salmonella utiliza las señales de transducción del hospedero, lo cual afecta el re arreglo del citoesqueleto y proteínas membrana produciendo el rizamiento de membrana y la invasión bacteriana. (9)

4. SISTEMAS DE SECRECIÓN

Una característica esencial de la patogenicidad de Salmonella es su habilidad de engañar a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera. Salmonella responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Tipo III o dependiente de contacto. Este sistema permite a ciertos bacilos gram negativos secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica, y se ha encontrado en Yersinia, Erwinia, E. coli enteropatógena, Shigella, Pseudomonas aeruginosa, Chlamydia y en patógenos de plantas como Pseudomonas syringae.(9)

Las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos con funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera. En el caso de Salmonella, la redirección de señales celulares de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para colonización bacteriana y facilitando una estrategia patogénica altamente adaptada de líneas de

comunicación con la defensa del hospedero. La interacción de patógenos bacterianos dentro de las células hospederas, está particularmente caracterizada por factores que están localizados en la superficie bacteriana o son secretados en el espacio extracelular.(9)

El término "secreción" es usado para describir el transporte activo de proteínas del citoplasma a través de las membranas internas y externas en el sobrenadante bacteriano o en la superficie de la célula bacteriana. La secreción es distinta de la exportación, la cual se refiere al transporte de proteínas del citoplasma en el espacio periplásmico. Existen cinco tipos de sistema de secreción, que se diferencian en la forma en que las proteínas son transportadas a través de la membrana externa al espacio periplásmico. Todos los sistemas de secreción utilizan la energía obtenida por la hidrólisis del ATP para transportar las proteínas. Los sistemas de secreción Tipo I y Tipo III transportan las proteínas directamente del citoplasma de la bacteria hasta el citoplasma de la célula eucariótica, sin pasar por el periplasma. El sistema de secreción tipo II funciona de manera diferente, la proteína que se encuentra en el citoplasma de la bacteria no pasa directamente a la célula eucariótica, tiene un paso intermedio en el periplasma de la bacteria donde sufre un proceso de descarboxilación en el N – terminal, haciendo que la proteína que sale a la célula eucariótica sea diferente a la que se encuentra en el citoplasma de la bacteria. El sistema de secreción tipo II y tipo III tienen en común la parte que se encuentra en la membrana externa de la bacteria.(9)

Salmonella es la única bacteria descrita que contiene dos sistemas de secreción tipo III; estos son maquinarias dedicadas a la translocación de proteínas que permiten a las proteínas bacterianas de patogenicidad ser

liberadas directamente en el citosol de células hospederas eucarióticas. Los dos sistemas de secreción tipo III de Salmonella son codificados en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI 1 y SPI 2), los cuales parecen jugar dos papeles diferentes durante la patogénesis, SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y SPI 2 necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica. (9)

El término SPI fue utilizado inicialmente para describir dos grandes e inestables piezas de DNA cromosomal en E. coli enteropatógena, que codifica un número de proteínas reguladoras importantes para la virulencia. La isla de patogenicidad I es requerida para el ingreso de Salmonella a la célula hospedera, está localizada en su centísoma 63 y en ella se encuentran genes implicados en su patogenicidad. Está dividida en dos grupos de genes que codifican la maquinaria de secreción para invadir la mucosa: inv-spa y prgorg ; estos genes se encargan de codificar proteínas que cumplen con diversas funciones en el proceso de invasión.(9)

5. PROTEÍNAS REGULADORAS

Los genes de SPI 1 son expresados en forma máxima a 37C y bajo condiciones de oxígeno limitado, además la expresión es óptima a pH neutro, a alta osmolaridad, y durante la última fase de crecimiento logarítmico. La expresión de los genes de invasión también requiere la proteína reguladora central HilA, la cual es codificada por el gen hil A en SPI 1, la proteína HilA es requerida para la expresión del sistema de secreción tipo III. El gen hilA es un regulador transcripcional de genes de invasión, su expresión es activada por la proteína SirA que es codificado

por el gen *silA*; la proteína se cree que es estimulada por dos vías mutuamente independientes: la activación por la proteína BarA que es una sensor kinasa que tiene como blanco a *SirA* o la fosforilación de *SirA* dada por la intervención del intermediario metabólico, acetil fosfato.(9)

Actualmente se conoce que el gen *hilD* también reprime la expresión de *hilA* cuando las condiciones ambientales no son favorables para la invasión.

La expresión de *hilA* también es regulada por PhoP - PhoQ un sistema de dos componentes que gobierna la virulencia, mediante la adaptación a medios ambientes limitados en magnesio y regula numerosas actividades celulares en varias especies de gram negativos entre ellos *Salmonella*. (9)

6. ORIGEN GENÉTICO DE LAS ISLAS DE PATOGENICIDAD

No todas las islas de patogenicidad son genéticamente inestables pero muestran un origen extraño. Estas piezas de DNA frecuentemente no están en bacterias no patógenas relacionadas. Se cree que las islas de patogenicidad y por ende los sistemas tipo III fueron adquiridos horizontalmente a través de una bacteria facilitadora en un "salto cuántico evolucionario" en patogénesis bacteriana.

El sistema de secreción tipo III está compuesto por una organela considerable llamada el complejo aguja. La arquitectura de este complejo semeja el complejo cuerpo basal del gancho flagelar, sugiriendo una relación evolucionaria entre estas dos estructuras. El complejo aguja se extiende entre la membrana interna y externa de la pared bacteriana. (9)

Está compuesto de dos pares de anillos internos y externos que presumiblemente anclan la estructura a la membrana interna y externa de la pared bacteriana. Los anillos están conectados por una estructura como de vara, las cuales forman la base del complejo. Una estructura aguja de 80 nm de longitud sobresale afuera de la base del complejo. La estructura entera es de 100 nm de largo y de 40 nm en diámetro en la parte mas ancha.

El sistema de secreción tipo III del centisoma 63 dirige la exportación de varias proteínas como ATPasas, proteínas regulatorias y estructurales, formadoras de canales, lipoproteínas, moléculas efectoras para células hospederas, chaperonas, etc. Algunas de estas proteínas transitoriamente ensamblan una estructura apendicular llamada invasoma, mientras otras son translocadas en la célula hospedera donde ellas activan o interfieren con las vías de transducción de señales célula hospedero conduciendo a una variedad de respuestas. (9)

Estas respuestas son dependientes del tipo de célula infectada. En células no fagocíticas, *Salmonella* induce cambios en la membrana plasmática de la célula hospedera, y profundos rearrreglos del citoesqueleto que se parecen estructuralmente al rizamiento de membrana inducido por varios agonistas, como hormonas, factores de crecimiento, etc. (9)

7. LA ISLA DE PATOGENICIDAD-1 (SPI-1)

La SPI-1 fue el primer locus mayor de patogenicidad descrito para *Salmonella*. Fue encontrado en base a una propiedad fundamental, la invasividad. La idea inicial fue identificar una mutante natural de *S. typhimurium* que no invadiera células epiteliales en cultivo. Posteriormente, se clonó en un plásmido vector una mezcla de fragmentos del genoma de

una cepa naturalmente invasiva (banco de genes), y se introdujo (complementó) a células de la mutante, identificando un fragmento que le confería la capacidad invasiva. Así se aisló un fragmento que contenía genes de invasividad, que fue denominado *invCBA*. Posteriormente, se realizó mutagénesis dirigida de este locus (o sitio del genoma) en la cepa silvestre invasiva, con transposones (fragmentos de ADN que se insertan en otro ADN causando su mutación), confirmando que, al hacerlo, se disminuía la capacidad invasiva. Esta región ha sido extensamente estudiada y el número de genes en él contenida se ha extendido a 30. Se encuentra en el centisoma 63 y abarca 40 kb. (4)

Así, los genes *inv* originales se han extendido a *invJICBAEGFH*, en donde la mayoría forman parte de un sistema de secreción tipo III, y donde las proteínas InvJ e InvH son secretados. Un sistema de secreción tipo III es, esencialmente, uno que se activa por contacto de la bacteria con las células hospedantes. Estos sistemas forman un puente de proteínas (pudiendo ser en forma de aguja), a través del cual atraviesan moléculas que ejercerán un efecto sobre la célula hospedante. De hecho, por ello, algunas de las proteínas del sistema de secreción tipo III forman parte de la membrana interna y otras son exportadas. También participan en la secreción los genes *spaSRQPO* (denominados así por su similitud con los genes de otra bacteria invasiva, *Shigella*) y los genes *sipADCB* ("salmonella invasion proteins"). (4)

El locus *invC* codifica para una ATPasa que aparentemente provee energía para el proceso; y *sptP* codifica para una fosfatasa que actúa sobre las tirosinas de proteínas de la célula hospedante ("salmonella protein tyrosine phosphatase"), alterando la transducción de señales.

De manera global, la bacteria busca a través de éste y otros sistemas, alterar la célula hospedante (por ejemplo, una célula epitelial) a fin de penetrarla, se ha observado, por ejemplo, que *Salmonella* causa un fenómeno de arrugamiento u oleaje, por desarreglos causados en el citoesqueleto; para después ser engullido empezar a multiplicarse en un compartimento vacuolar.(4)

Curiosamente, el gen regulador *hilA* fue descubierto independientemente porque su sobre expresión confería capacidad hiperinvasiva a la *Salmonella* ("hyper invasive locus"). Se ha determinado que codifica para un regulador que activa los promotores para los genes *inv* y *spa*, *sip* y *org* ("oxygen-regulated gene"). El locus *invF*, a su vez, codifica para un regulador positivo para otros genes del locus. El locus *sicA* codifica para una proteína chaperona ("salmonella invasion chaperone"), que actúa en conjunción con la proteína reguladora InvF. Los genes *prgKJIH* ("PhoP repressed genes") son prendidos por la proteína HilA y apagados por la proteína reguladora PhoP, la cual también tiene un efecto regulador negativo sobre la expresión de *hilA*. La expresión de HilA, a su vez, es regulada positivamente por otro sistema regulador SirA/SirC.(4)

De esta manera, una secuencia de eventos podría ser:

- a) Las proteínas SirA y SirC promueven la transcripción de los locus *hilC* y *hilD*, produciéndose las proteínas HilC y HilD.
- b) Las proteínas SirA, SirC, HilC y HilD se asocian a la ARN polimerasa para prender la transcripción de los genes *orgA*, *prg* y *hilA*.
- c) Las proteínas HilA y SirC se asocian a la ARN polimerasa para transcribir a partir de los operones *inv* y *sip*.

- d) El aumento en la proteína PhoP inhibe la transcripción de los genes *hilC* y *hilD*, *orgA* y *prg*, y *hilA*, causando una disminución de la proteína activadora HilA
- e) El agotamiento de HilA causa el apagamiento de la transcripción en todo el sistema.

Este circuito ilustra cómo ha evolucionado un sistema de prendido y apagado de genes en bacterias; y nos da la idea de cuán complejo pueden ser los procesos de virulencia en *Salmonella*, sobre todo si consideramos que hay muchos otros genes involucrados en patogénesis.
(4)

H. BASES MOLECULARES DE *Salmonella typhi*

1. TAXONOMÍA MOLECULAR

Se ha utilizado la electroforesis multilocus de enzimas para caracterizar diferentes cepas bacterianas, incluyendo las de *S. typhi*. En este método se separan por electroforesis los componentes de un extracto celular, bajo condiciones que permiten el ensayo de la actividad de una batería de enzimas. Así, la actividad de veinte o más enzimas se asocia a la banda de la proteína respectiva, que migra en el gel de acuerdo a su carga y tamaño. Las variaciones en el genoma de la bacteria pueden reflejarse en alteraciones en la migración de alguna o más enzimas (que representan varios loci o genes), por lo que pueden obtenerse electroferotipos, o

patrones de migración específicos que permiten distinguir una cepa de otra. De esta manera, se ha concluido que *Salmonella typhi* es de naturaleza clonal, es decir que ha variado poco en la evolución, al menos con respecto a una serie de enzimas básicas de su metabolismo. (4)

Otra manera de clasificar a las bacterias es por electroforesis de campo pulsante. En este método, se digiere el genoma de la bacteria con una enzima de restricción que corta poco frecuente, es decir, que produce fragmentos grandes de ADN (mayores a 20 kb o 20,000 pares de bases). Estos fragmentos se separan por electroforesis en gel bajo un campo eléctrico pulsado, lo que hace que el ADN tome diferentes orientaciones alternas durante la migración. Interesantemente, esta metodología mostró que el cromosoma de *Salmonella typhi* es mucho más variable de lo que se pensaba bajo el concepto de cepas clonales, habiéndose identificado patrones de migración electroforética comunes para cepas correlacionadas geográficamente. También se observó que el cromosoma fluctúa en tamaño entre 3.96 y 4.92 Mb, o millones de pares de bases.(4)

El análisis de plásmidos o moléculas circulares de ADN con replicación autónoma al cromosoma, que se transfieren de manera horizontal entre bacterias, y que codifican para resistencia a antibióticos o factores de virulencia, ha revelado que la gran mayoría de las cepas de *Salmonella typhi* carecen de ellos. Solamente las cepas con resistencia múltiple a antibióticos las poseen, y éstas han aparecido esporádicamente aunque su presencia se ha incrementado en los últimos años. De esta manera, no hay un método general de tipificación de *Salmonella* por perfil de plásmidos. (4)

Las huellas genéticas de las bacterias, y de las salmonelas en particular, se han generado por la hibridación de fragmentos de ADN con sondas de regiones o genes repetidos en el genoma, marcadas radioactivamente. Los fragmentos de ADN se obtienen por el corte con enzimas de restricción, se separan por electroforesis a través de un gel y se transfieren a un papel filtro.

De esta manera, se producen columnas con bandas de diferentes tamaños (o posición en la columna) que distinguen a una cepa en particular; en un formato similar a una barra de identificación en los productos del supermercado. Para este propósito se han utilizado genes ribosomales, de los cuales hay siete copias, o de la secuencia de inserción *IS200*, de la cual hay convenientemente más de quince copias en el genoma de *S. typhi*, aunque otros serotipos tienen un número menor de copias.(4)

De manera similar, se han utilizado genes no repetidos para tipificar cepas de *Salmonella* sp. y cepas de *S. typhi*, los cuales han incluido genes del flagelo (*flj*), de invasividad (*inv*), del antígeno capsular (*via*), del LPS (*rfb*), de antígenos de superficie (*omp*), de proteínas de estrés (*groEL*), o de islas de patogenicidad (SPI-1 y SPI-2). De hecho, estos estudios y la caracterización de la secuencia nucleotídica de éstos y otros genes, ha permitido determinar que las salmonellas pertenecen a un solo género, *Salmonella enterica*, por su alto grado de conservación genética.(4)

2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El paradigma de los genomas de bacterias entéricas es ciertamente el de la *Escherichia coli* K-12, bacteria comensal que convive con el ser humano. Actualmente, es el organismo mejor estudiado a nivel molecular, genético, bioquímico y fisiológico. La estructura general del cromosoma y el orden génico están muy conservados entre *Escherichia coli* K-12 y *S. typhimurium* LT2, aunque con algunas diferencias. Hay segmentos presentes en una pero no en la otra bacteria y una inversión que abarca el 11% del genoma. De hecho, en general, todas las salmonellas mantienen el mismo orden génico que *Escherichia coli* K-12, pero con inversiones de segmentos varios. (4)

El genoma de *Salmonella typhi* CT18 está constituido por un cromosoma circular de 4,809,036 pb, con un contenido de G+C de 52.09 %, más dos plásmidos: el pHCM1 de 218,160 pb, que codifica para resistencia múltiple a antibióticos, y pHCM2 de 106,516 pb, que es críptico o de función desconocida. Al igual que *E. coli*, contiene más de cuatro mil genes. *Salmonella typhi* constituye una excepción a la conservación del orden cromosómico, porque presenta rearrreglos mayores observados entre diferentes aislados clínicos. Existen inversiones y transposiciones de grandes segmentos, posiblemente promovidos por recombinación homóloga entre genes ribosomales (*rrn*), y no se observan pérdidas, inserciones, o duplicaciones de regiones cromosómicas. (4)

Otras variantes entre los genomas de las salmonellas incluyen la presencia o ausencia de diferentes islas de patogenicidad y de operones para fimbrias. (4)

3. EL SISTEMA PHOP/PHOQ

El papel de este sistema en la virulencia se estableció, por primera vez, cuando se probó la capacidad infectiva de diversas mutantes en genes de reguladores ya caracterizados. Se encontró que una mutante en *phoPQ* causaba una disminución considerable en la virulencia, cuando la *Salmonella* era inyectada intraperitonealmente. Es decir, la dosis letal media (LD50), o la cantidad de bacterias de la mutante requerida para matar a la mitad de una población de ratones de laboratorio, era mucho mayor que la que se requería de la silvestre. El locus *phoP/phoQ* había sido descrito con anterioridad por su capacidad de regular una fosfatasa ácida; de ahí el prefijo *pho* (del inglés "phosphatase"), que curiosamente no se regulaba por la presencia de cantidades bajas de fosfato, por lo que se le considera una fosfatasa no-específica cuyo papel en la fisiología de la bacteria es desconocido. (4)

Este es un sistema de dos componentes, en donde PhoP regula la expresión de varios genes en el citoplasma, es decir, tiene un efecto pleiotrópico. Algunos son apagados, los *prg*, como los descritos en la sección anterior, y otros son activados, los *pag* ("PhoP activated genes"). PhoP a su vez es activada por la fosforilación proveniente de PhoQ, una proteína de membrana interna que percibe señales del exterior. Una de las señales es la baja concentración del ión magnesio, la cual causa un cambio conformacional en PhoQ con la consecuente fosforilación de una histidina de PhoP a partir del ATP (actividad de histidina cinasa). Más aún, se ha observado que este sistema se activa dentro de las vacuolas del macrófago, en donde residen las salmonellas. Es así que se postula que la

bacteria mantiene prendidos los genes *prg* antes de invadir los macrófagos, y por ello tienen un papel en este estadio; para después apagarlos en cuanto se prende el sistema y, por consecuencia, activar a los genes *pag* que tendrían un papel en los estadios tardíos de la invasión.(4)

4. OTROS LOCI DE PATOGÉNESIS

Se ha observado la presencia de varios operones o grupos de genes que codifican para fimbrias, o estructuras proteicas en forma de espinas que se proyectan hacia el exterior, que permiten a la bacteria adherirse a diferentes superficies incluyendo células del hospedante. *Salmonella typhi* contiene una porción de estos operones como los *lpf* (de "long polar fimbriae"), los *fim* y *agf*. Otros operones fimbriales están presentes en serotipos de *Salmonella* frecuentemente aislados de animales domésticos.(4)

I. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DE *Salmonella typhi*.

El fragmento 1.8 Kb Hin III del ADN cromosómico de *Salmonella typhimurium*, fue utilizado para desarrollar puntas de prueba para la detección de *Salmonella* en diferentes muestras ya sean alimentos o muestras biológicas. Se examinó seis puntas de prueba que tenían secuencias dentro de este fragmento de 1.8 Kb, de las cuales sólo tres fueron altamente específicas para *Salmonella*. Las otras tres puntas de prueba (TS1, TS2, TS3) fueron encontradas inadecuadas porque se

observaron reacciones falsas positivas con *Escherichia coli* y *Citrobacter*. Estas reacciones cruzadas no fueron observadas utilizando los dos grupos de primers BR-Sal A, BR-Sal B; BR-Sal IA, BR-Sal IB, utilizadas en esta técnica molecular. (10)

Los primers BR-Sal A, BR-Sal B, son los primeros que actúan en la fase inicial del Nested-PCR, siendo estos los que amplificarán la secuencia cromosómica de *Salmonella typhi*, pero debemos tomar en cuenta que, la bacteria en estudio, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, teniendo cierta similitud en su secuencia cromosómica con *Shigella*, *Escherichia coli*, y *Citrobacter*, pudiendo dar reacciones cruzadas con estas bacterias.

Los Primers BR-Sal IA, BR-Sal IB, son mucho mas específicos ya que estos amplifican el producto obtenido de la primera fase del Nested-PCR, evitando las reacciones cruzadas con otras bacterias ya que su secuencia es mucho mas específica para *Salmonella typhi*.

Se puede realizar este tipo de pruebas que abarcan todos los tipos de muestras obtenidas de seres humanos y de otros animales, incluyendo fluidos corporales tales como orina, sangre, materia fecal, liquido cefalorraquideo así como tejidos sólidos sin tener que pasar previamente por cultivos del microorganismo.(10)

J. IDENTIFICACION DE LA BACTERIA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

1. Agar triple azúcar Hierro (TSI)

Determina la capacidad que tienen las diferentes enterobacterias de fermentar un hidrato de carbono (glucosa, Sacarosa, y lactosa) o de hacerlo simplemente a partir de uno o dos azúcares.

La capacidad de formar *hidrógeno sulfurado* a partir de la reducción de tiosulfato y la capacidad de producir gas o no. (11)

Cuando un microorganismo fermenta glucosa, entonces se observa la superficie inclinada alcalina, es decir mantiene el color rojizo, pero en la profundidad se torna ácida, (amarilla) indicando la existencia de fermentación de glucosa, y no de lactosa, también se observa la producción de sulfuro de hidrógeno que se observa en el fondo del tubo.(8)

2. Lisina descarboxilasa (LIA)

Este agar lisina hierro, usado como ayuda para la identificación de Salmonela, la mayoría de las cuales son sulfuro de hidrógeno positivo, como lisina descarboxilasa positivas. Un LIA con coloración negra en profundidad y una superficie inclinada púrpura indica virtualmente especies de *Salmonella*. (11)

3. Medio Sulfuro Indol Motilidad (SIM)

La capacidad que tienen algunas bacterias de poder formar sulfuro de hierro, como consecuencia de la reducción de tiosulfato a sulfuro de hidrógeno, el cual funciona como sal férrica. También está incluida la capacidad de formar indol a partir del triptófano y finalmente la presencia o ausencia de movilidad bacteriana. En este caso al añadir el reactivo de Kovac no se formará la producción de indol, ya que *Salmonella* da negativo para indol, pero positivo para la motilidad. (11)

4. Producción de Ureasa.

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amonio y se produce un cambio de color rosado-rojo en el medio. La especie de *Salmonella* tiene una reacción negativa frente a este reactivo, a comparación de la especie de *Proteus* que da una reacción positiva. (8)

5. Prueba del Citrato.

Determinar la capacidad de un microorganismo para usar citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento. La producción de color azul en el medio indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo de la prueba de utilización de citrato de Simmons. *Salmonella* generalmente da positivo para esta prueba. (8)

K. NESTED PCR.

PCR interna o PCR anidada es una Técnica que comporta dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) sucesivas, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda PCR (*internal* o *nested PCR*) flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (*external PCR*).

El método de la PCR interna se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con la PCR clásica, dado que en cada etapa se realiza un número menor de ciclos. Aunque el método en sí comprende dos reacciones en cadena de la polimerasa consecutivas, lleva el nombre de la segunda PCR (la *internal PCR* o *nested PCR*) por ser esta segunda reacción la que aporta el amplicón de interés.

En castellano es más frecuente la denominación «PCR anidada», donde el adjetivo «anidado» se utiliza en sentido figurado como sinónimo de «interno», en referencia a los cebadores que se hibridan con regiones internas del primer amplicón.(12)

L. CUANTIFICACIÓN DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRIA

La determinación de la cantidad de ADN extraída de una muestra por cualquier técnica, tiene su importancia según el uso que se la va a dar a la molécula, lo que hace que las técnicas de extracción sean laboriosas y delicadas.(13)

En técnicas de Biología Molecular, como PCR y sus variantes, la cantidad de ADN es de suma importancia, por la relación estequiométrica que se debe tener con respecto a los compuestos que permite estas reacciones; una mala dosificación hará que estas no se lleven a cabo.(13)

La cuantificación por espectrofotometría se basa en la espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 260 nm, longitud de onda en la que el ADN y RNA tienen la máxima absorbancia de luz; este método es rápido y no destructivo y se utiliza para determinar concentraciones menores a 2.5 ug/ml.(13)

Una desventaja de esta técnica es que no puede discriminar los tipos de ácidos nucleicos presentes, ni los nucleótidos sueltos en la muestra, es por eso, que se requiere de un ADN de alta pureza, que a veces no es posible obtenerla. (13)

Para determinar la pureza del ácido nucleico se efectúa la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm, puesto que las proteínas tienen una absorbancia máxima a 280 nm debido principalmente a residuos de triptófano, siendo la relación aceptable de 1.65 a 1.85, un valor mas bajo supone alta contaminación proteica, un valor alto supone una

contaminación con fenol, lo que caería en una sobreestimación de la concentración de ADN. (13)

M. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Dadas las variadas manifestaciones clínicas de las salmonelosis, la confirmación del diagnóstico de estas infecciones, requiere de métodos microbiológicos que permitan el aislamiento o identificación del agente causal o de pruebas serológicas que facilitan reconocer anticuerpos específicos presentes en el suero de los pacientes. (2)

1. **Hemocultivo:** es el procedimiento de elección, cuando se realiza apropiadamente y en medios selectivos a base de bilis. Coincidiendo con la fisiopatología de la infección, son positivos especialmente durante la primera semana de la infección; se calcula que al final de la tercera semana de positividad solamente alcanza un 50%.(2)
2. **Mielocultivo:** el cultivo del aspirado de médula ósea se considera como el mejor método para el aislamiento de salmonella en los pacientes con fiebre tifoidea y paratifoidea. Aunque el procedimiento produce una molestia transitoria, en general es bien tolerado y los cultivos son más rápidamente positivos. Pueden ser positivos aún cuando los hemocultivos sean negativos.(2)
3. **Coprocultivo:** puede ser positivo desde el comienzo de la infección, aunque su máxima positividad en la infección aguda, se observa durante la tercera semana. Es particularmente útil para el control postratamiento de los pacientes y para detectar los portadores crónicos.(2)

4. **Cultivo de bilis duodenal:** obtenido por aspiración o utilizando la técnica que lleva un dispositivo en cápsulas de gelatina. No es superior al hemocultivo y con certeza no supera a la asociación del hemocultivo con el coprocultivo. (2)
5. **Urocultivo:** su valor diagnóstico es muy limitado pues la bacteriuria no es continua. Su máxima positividad está en la tercera semana. La Salmonella también puede ser aislada de otros productos como las manchas rosadas o reoseolas tíficas, de la secreción bronquial, del líquido articular, etc.(2)

N. DIAGNOSTICO SEROLOGICO

1. Reacción de seroaglutinación (Widal)

Es de poco valor como prueba diagnóstica. En la infección no tratada sólo cerca del 50% de los pacientes pueden tener un aumento significativo de las aglutininas contra el antígeno "O", en algún momento de la enfermedad.

Las aglutininas contra el antígeno "H" no tienen valor diagnóstico aunque puedan observarse títulos elevados de ellas. En muchos casos de fiebre tifoidea no hay elevación de los títulos de aglutininas durante el curso de la infección y en ocasiones se pueden observar elevaciones no específicas, debido a reacciones cruzadas.(2)

O. TRATAMIENTO

En la terapéutica de la fiebre tifoidea y las fiebres entéricas se deben considerar:

- a. El tratamiento antibacteriano específico
- b. Las medidas generales de soporte

1. Tratamiento específico:

En la actualidad se dispone de varios antimicrobianos útiles para el tratamiento de las infecciones por salmonella, dentro de las cuales están el cloramfenicol, la ampicilina, la amoxicilina, el cotrimoxazol, las cefalosporinas de tercera generación, como la cefotaxina, la cefoperazona, la ceftriaxona; y las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y la ofloxacina.(2)

Cloramfenicol: continúa siendo el medicamento de primera elección para el tratamiento de las infecciones por *S.typhi* sensibles. Tiene muy buena difusión tisular y bajo costo. La dosis diaria es de 50 mg/kg/día repartida en cuatro tomas. Se recomienda la administración por 15 días más a partir del momento de la apirexia. (2)

Ampicilina: tiene buena concentración sanguínea y linfática; cuando se administra por vía oral se concentra y elimina en forma activa por la bilis. Dosis: 100 mg/kg/día. Por 10 a 15 días..(2)

Amoxicilina: del grupo de las ampicilinas, tiene la ventaja de tener mejor absorción, mayor concentración y menores efectos gastrointestinales que la ampicilina. Dosis: 100 mg/kg/día, por 10 a 15 días. (2)

Cotrimoxazol: se utiliza en el tratamiento de fiebres entéricas incluida la fiebre tifoidea. Los resultados han sido variables.

Fluoroquinolonas: varias de ellas han demostrado ser muy activas in vitro contra salmonella, incluida la *S.typhi*. Dentro de éstas la ciprofloxacina es una buena alternativa. La norfloxacina es útil en el tratamiento de portadores crónicos de *S.typhi*, observándose negativización de las heces y la bilis en dosis de 400 mgs. Igualmente, ha sido utilizada la ofloxacina en el tratamiento de los portadores crónicos.(2)

Cefalosporinas: dentro de éstas, las cefalosporinas de tercera generación son las mejor estudiadas en el tratamiento de las bacteremias y fiebres entéricas por salmonella, incluidas aquellas por *S.typhi*. Los mejores resultados observados son los obtenidos con la cefoperazona y la ceftriaxona. (2)

Corticoides: el uso de dosis elevadas de dexametasona en el manejo de la fiebre tifoidea y solo debe ser usada en el tratamiento de la fiebre tifoidea severa y en forma temprana. De ésta manera de dexametasona puede reducir la mortalidad en forma importante.(2)

2. Medidas generales:

Dentro de ellas están el reposo, los cuidados de enfermería que permitan mantener el control del estado de conciencia, la tensión arterial, el pulso, la diuresis, evitar las úlceras cutáneas, las lesiones de la boca, los ojos, o detectar en forma temprana cualquier complicación. Se deben mantener una adecuada hidratación y el control de líquidos y electrolitos.(2)

No se recomienda el uso de la aspirina por el riesgo de producir hipotermia profunda o hipotensión; tampoco es recomendable el uso de antidiarréicos pues la falta de motilidad intestinal puede producir perforación intestinal.(2)

P. TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES (2)

1. **Recaídas:** en la fiebre tifoidea se recomienda seguir un esquema similar al del episodio agudo y la colecistectomía como medida complementaria.
2. **Enterorragias:** dependiendo del volumen se trata con transfusión de glóbulos rojos y líquidos parenterales.
3. **Perforación:** es la más temida de las complicaciones. Usualmente se requiere la administración de otros antibióticos, tales como aminoglucósidos, cefalosporinas antipseudomonas, metronidazol y de otras medidas para el control del choque séptico por la peritonitis.
4. **Abscesos:** cuando estos aparecen es necesario drenarlos quirúrgicamente.
5. **Tratamiento de los portadores:** se utilizan varios antibióticos dentro de los cuales están la ampicilina, la amoxicilina, y el sulfametoxazol - trimetoprim. Se utilizan con éxito las quinolonas en especial la ciprofloxacina y la ofloxacina. Es recomendable practicar la colecistectomía.

6. **Prevención:** está orientada en primer lugar al control y tratamiento de las fuentes de agua y de los sistemas de abastecimiento, a través de controles sanitarios apropiados, que garanticen su potabilidad.

7. **Vacunas:** En la actualidad existen dos: una para administración oral y otra parenteral. Están indicadas para las personas que viajan a regiones endémicas, para las que viven en regiones de alta incidencia, para las que habitan en instituciones de condiciones sanitarias deficientes y para los contactos caseros de los portadores de *S.typhi*. Los refuerzos deben ser administrados cada cinco y tres años para las formas oral y parenteral.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Realizar la optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidado (Nested - PCR), para la identificación de *Salmonella typhi* en sangre periférica humana.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

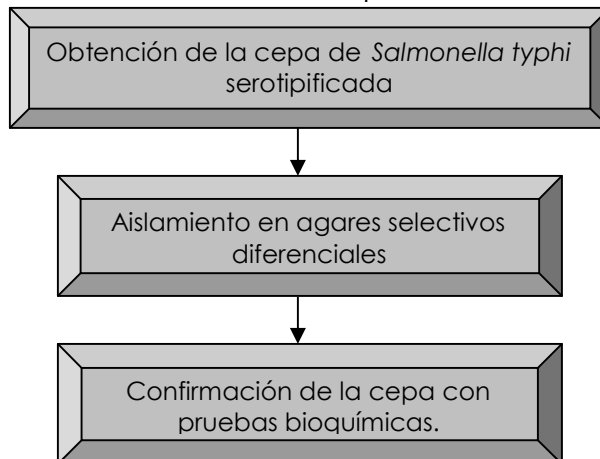
1. Determinar mediante cultivo microbiológico y recuento en placa la población bacteriana inoculada en sangre periférica.
2. Optimizar la técnica de extracción de ADN de *Salmonella typhi* a partir de sangre periférica humana.
3. Cuantificar el ADN de *Salmonella typhi* extraído de sangre periférica humana mediante espectrofotometría.
4. Optimizar el Nested- PCR para la identificación de *Salmonella typhi* en sangre periférica.

DISEÑO EXPERIMENTAL

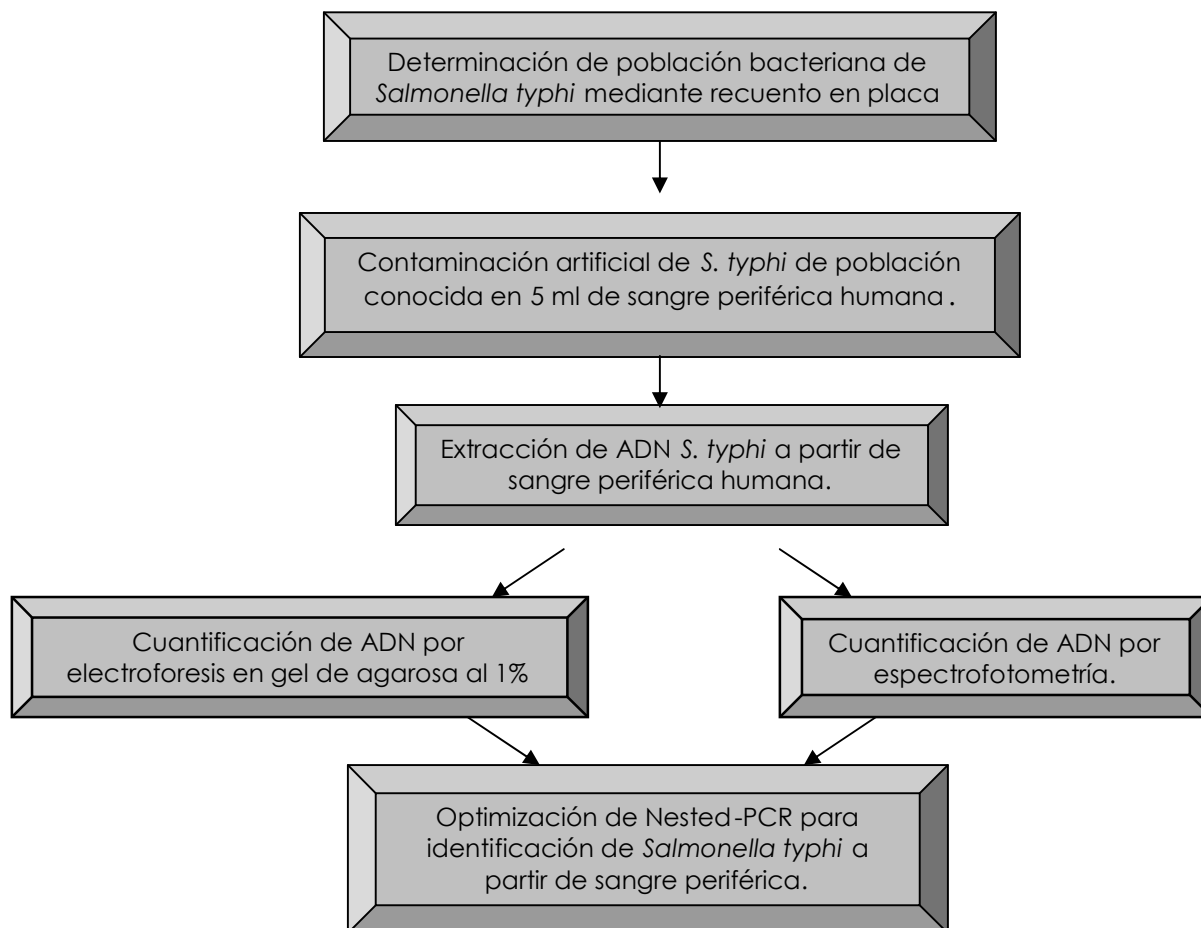
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la obtención de resultados favorables el trabajo se realizó en dos fases:

1. Primera fase.- Identificación de la cepa de *Salmonella typhi*.



2. Segunda fase.- optimización de las técnicas moleculares



A. CEPA

Se utilizó una cepa de *Salmonella typhi* serotipificada, que fue proporcionada gentilmente por el Instituto Nacional de Laboratorio en Salud INLASA.

B. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

A la cepa obtenida, se le realizaron pruebas bioquímicas para la confirmación de *Salmonella typhi*, dando las características propias de este microorganismo. (Anexo 1)

C. PREPARACION DE LAS DILUCIONES

De la cepa control, se tomó un inóculo de 1 colonia y se llevó a 10 ml de caldo BHI, se incubó por 24 hrs a 37°C. Esperando la fase logarítmica de la bacteria, luego se realizaron diferentes diluciones usando como diluyente agua de peptona 0,1%, se utilizaron las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} para realizar la contaminación en sangre periférica humana.

D. MUESTRAS

Para la realización del presente trabajo se utilizó 5 mL de sangre periférica humana con 200 μ l de EDTA. A cada muestra sanguínea se contaminó con 1 ml de la suspensión bacteriana preparada en agua de peptona al 0,1% correspondiendo a las diluciones realizadas.

E. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA POR RECuento EN PLACA

El agar PCA (Agar peptona de caseína -glucosa-extracto de levadura), es un medio de cultivo de sustancias inhibidoras y de indicadores (8).

Se utilizó el medio PCA (Plate count agar), para realizar el recuento de colonias, de las diluciones realizadas se sembró 1 ml de cada una de las diluciones en diferentes cajas petry que contenía el medio Plate count, esto para determinar la cantidad exacta de bacterias en un mililitro de las diluciones.

F. CONTAMINACION EN SANGRE PERIFERICA

La contaminación se realizó en 5 ml de sangre periférica humana, que contenían 200 ul de EDTA, a las que se adicionó 1 ml de cada dilución de la suspensión bacteriana, y se tomó 1 ml para la extracción de ADN.

G. EXTRACCION DE ADN DE *Salmonella typhi* A PARTIR DE CULTIVO.

Se aislaron colonias de *Salmonella typhi*, para ello se sembraron en agares diferenciales que contengan fuentes de sulfuro de hidrógeno, como Agar XLD y Agar S-S.

Se utilizaron diferentes protocolos para obtener el ADN cromosómico de *Salmonella typhi*, de cultivos puros de la bacteria utilizados como cepa control para la extracción de ADN.

1. Variante A

Se identificaron los tubos eppendorf para la extracción, se añadió 1 ml de agua estéril, se transfirieron al eppendorf 3 colonias de *Salmonella typhi* sembradas en medio XLD e incubadas a 35°C por 24 horas, se procedió a mezclar por pipeteo, luego se llevó a incubar por 10 minutos a 95-100°C, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante a otro eppendorf estéril e identificado y se guardó a -20°C.

Se realizó una corrida el gel de agarosa al 1%, utilizando tampón TBE 1x para la corrida electroforética, durante 30 minutos a 350 mA, y a un voltaje de 105 v/cm.

2. Variante B.

Se identificaron los tubos eppendorf estériles, se añadió 1 ml del caldo BHI, que contenía a *Samonella typhi* a 35°C por 24 horas; luego se llevo a incubación por 10 minutos a 95 – 100°C, controlando esta temperatura con un termómetro, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante a otro eppendorf estéril e identificado y se guardó a -20°C. Se realizó la corrida electroforética para observar el ADN.

3. Variante C

Se identificaron los tubos eppendorf estériles, al tubo se añadió 300 ul de PBS y 3 colonias de *Salmonella typhi* sembradas en medio XLD e incubada a 35°C por 24 horas, se homogenizó y se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con 300 ul de PBS, se homogenizó y se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos, se

resuspendió el precipitado con 300 ul de agua estéril, se incubó por 10 minutos a 100°C controlando la temperatura con termómetro, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos, el sobrenadante se transfirió a otro eppendorf estéril, y se conservó a -20 °C.

Se realizó la corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % para determinar la existencia de ADN de la bacteria.

I. CUANTIFICACIÓN DEL ADN DE *Salmonella Typhi*, POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Para la realización de la cuantificación del ADN de *Salmonella typhi*, se utilizaron cubetas de cuarzo, con capacidad de 1 ml, se utilizó un espectrofotómetro y se realizaron lecturas a 260 nm y a 280 nm, para realizar la cuantificación del ADN de la bacteria, y la cantidad de proteínas existentes de la extracción.

Para esta cuantificación se añadió 995 ul de agua tridestilada con 5 ul de la muestra para llegar a un volumen final de 1000 ul, en la cubeta de cuarzo con capacidad de 1 ml. Se utilizó como blanco reactivo agua tridestilada estéril y se procedió a la lectura de las absorbancias a una densidad óptica de 260 nm y de 280 nm.

J. REALIZACIÓN DEL NESTED-PCR PARA *Salmonella typhi*

1. Preparación de la mezcla principal de reactivos

Se realizó en el cuarto blanco (Anexo 2), que es un ambiente estéril.

A través de cálculos realizados se obtuvieron las cantidades exactas de cada uno de los reactivos para un volumen final de 25 ul.

Antes de realizar la Mezcla de reactivos, se irradió el cuarto blanco con luz UV, para la descontaminación del material a usar, como ser: tips, gradillas, gorro, guantes, mangas, barbijo, micropipetas y tubos PCR.

Para la identificación de ADN de *Salmonella typhi*, se realiza en dos partes ya que en eso consiste el Nested-PCR, en la primera etapa se realiza la amplificación del ADN cromosómico de la bacteria, utilizando para este caso, los primeros cebadores que amplifiquen al ADN de *Salmonella typhi*, es decir BR Sal A, BR Sal B, en la segunda etapa se utiliza otra Mezcla de reactivos pero esta vez la muestra a amplificar es el resultado de la primera amplificación realizada anteriormente en la primera etapa, los cebadores utilizados en este caso son diferentes a los utilizados en la primera etapa los cebadores son BR Sal 1 A, BR Sal 1 B.

Los Cebadores BR-Sal A y BR-Sal B, amplificarán en una primera etapa el ADN cromosómico de *Salmonella typhi*, de las muestras extraídas, estos Cebadores tienen la siguiente secuencia.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores BRSal A, BRSal B

Cebadores	Secuencia
BR- Sal A	5' ACG GTT GTT TAG CCT GAT AC 3'
BR -Sal B	5' CTG GAT GAT ATG GAA GAA TG 3'

Para la segunda etapa se requieren de los Cebadores BR-Sal 1A y BR-Sal 1B, que serán los que amplificarán el producto obtenido de la primera etapa, estos cebadores tienen la siguiente secuencia.

TABLA 4. Secuencia de los cebadores BRSal 1A, BRSal 1B

Cebadores	Secuencia
BR- Sal 1 A	5' GTT CGG CAT TGT TAT TTC T 3'
BR -Sal 1 B	5' CTC AGG GTC ATC GTT ATT C 3'

Los primers BR-Sal A, BR-Sal B, son los primeros que actúan en la fase inicial del Nested-PCR, siendo estos los que amplificarán la secuencia cromosómica de *Salmonella typhi*, pero debemos tomar en cuenta que, la bacteria en estudio, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, teniendo cierta similitud en su secuencia cromosómica con *Shigella*, *Escherichia coli*, y *Citrobacter*, pudiendo dar reacciones cruzadas con estas bacterias.

Los Primers BR-Sal 1A, BR-Sal 1B, son mucho mas específicos ya que estos amplifican el producto obtenido de la primera fase del Nested -PCR, evitando las reacciones cruzadas con otras bacterias ya que su secuencia es mucho mas específica para *Salmonella typhi*.

Se debe tomar en cuenta que para la realización de la Mezcla de reactivos necesitamos las concentraciones y los volúmenes exactos de cada uno de los reactivos, para obtener un óptimo resultado.

TABLA 5. Protocolo para la realización de la Mezcla principal de reactivos para la primera y segunda etapa.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL POR TUBO	VOLUMENPOR TUBO
Buffer 10x	10 x	1 x	2.5 ul
dNTPs	5 mM	0.2 mM	1 ul
Cebador 1	10 uM	0.4 uM	1 ul
Cebador 2	10 uM	0.4 uM	1 ul
Mg Cl₂	25 mM	2.5 mM	2.5 ul
H₂O	-	-	14.375 ul
Taq	5 U/ul	0.025 U/ul	0.125 ul

Una vez realizada la mezcla de los reactivos para el Nested PCR se añadió un volumen de 11.25 uL de la mezcla principal (Mix), a cada tubo, identificado anteriormente para cada muestra, luego se añadió 1.25 uL de la extracción de ADN realizada, se utilizaron controles de agua del cuarto blanco, y el cuarto gris (Anexo 2), para determinar si existe contaminación de estos ambientes, también se utilizaron controles negativos de otras extracciones de bacterias diferentes a *Salmonella typhi*, en este caso se utilizó ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y control positivo para realizar la comparación de las bandas obtenidas del ADN.

Para la realización de la segunda etapa se realizo de la misma manera que en la primera etapa pero con la diferencia que se utilizaron otros los segundos cebadores y la muestra a amplificar era el producto de la amplificación de la primera etapa.

En la realización del Nested-PCR se requirieron de diferentes ciclos, para cada etapa, así como existe diferencia en el tiempo y en la temperatura de cada una de las etapas de amplificación, para la obtención final de un producto que podrá ser observado posteriorme nte.

TABLA 6. Temperatura y tiempo de reacción de los cebadores BR-Sal IA y BR-Sal IB utilizados en la primera etapa por la técnica de Nested – PCR.

Cebadores BR-Sal IA y BR-Sal IB	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min.	94 °C
35 ciclos	2 min.	94 °C
	20 seg.	57 °C
	1 min.	72 °C
Extensión final	7 min.	72 °C

TABLA 7. Temperatura y tiempo de reacción de los cebadores BR-Sal 1A y BR-Sal 1B utilizados en la Segunda etapa por la técnica de Nested – PCR.

Cebadores BR-Sal 1A y BR-Sal 1B	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min.	95 °C
20 ciclos	30 seg. 1 min. 1 min.	94 °C 54 °C 72 °C
Extensión final	5 min.	72 °C

2. Siembra de los productos obtenidos

Posteriormente a la preparación de la Mezcla de reactivos, para la realización de la segunda parte del Nested PCR se sembraron los productos obtenidos anteriormente en la primera etapa con un volumen de 2.5 ul en cada uno de los tubos eppendorf que contenía ya la segunda Mezcla, para realizar la segunda parte del Nested PCR, esta siembra se realizó en el cuarto gris. (Anexo 2)

3. Amplificación de las extracciones de ADN

Se procedió a la realización del Nested-PCR, en el Termociclador Perkin Elmer 9600. El gen que amplifican los cebadores de Salmonella se encuentra en el fragmento 1.8 Kb Hind III del ADN cromosomal de la bacteria.

Aproximadamente el tiempo que tarda la amplificación, tanto en la primera etapa, como en la segunda etapa, son diferentes, en la primera etapa tarda 3 horas y media, para obtener el producto inicial, en la segunda etapa el tiempo de duración en el termociclador es aproximadamente de 1 hora y media para la obtención del producto final.

4. Revelado de los productos obtenidos de la amplificación

El revelado de las muestras se realiza en el cuarto negro, para ello se preparó un gel de agarosa al 1.5%; la cantidad suficiente para todas las muestras a revelar, a la agarosa se añade TBE 1X para que se disuelva, se llevó al microondas para que termine de disolverse la agarosa, se esperó a que enfrié un poco a temperatura ambiente y se añadió Bromuro de etidio, por cada 25 ml de TBE se añade 1 ul de Bromuro de etidio.

Una vez que gelifica, el gel de agarosa, se procedió a sembrar las muestras obtenidas del producto final de la amplificación de la extracción de ADN de las colonias, cada una de las muestras se mezclaron con azul de bromo fenol, la cantidad del amplificado que se utilizó es de 10 a 15 ul para el sembrado, se realiza la electroforesis a 350 mA, 30 minutos a un voltaje de 105 v/cm.

Después de la corrida electroforética se procedió a la observación de los productos finales amplificados, en el gel de agarosa mediante el transluminador Ultra violeta, que nos ayudan a la observación de las bandas de ADN amplificadas.

5. Realización de la extracción de ADN de *Salmonella typhi* a partir de Sangre periférica

5.1 Ensayo 1

Se utilizó la cepa de *S. typhi*, sembradas en medio Mc Konkey e incubadas a 37°C por 24 horas, se añadieron 2 colonias de la bacteria a un tubo que contenía 3 ml de agua estéril, se realizó una comparación con la escala de Mc Farland, hasta obtener el rango 0.5 que equivale aproximadamente 1.5 a 2×10^8 bacterias/ml proporcionado por INLASA para referencia bacteriológica y clínica.

A partir de esta concentración se realizaron diluciones de la suspensión bacteriana, hasta obtener la concentración de 10^1 bacterias/ml es decir, 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 .

Se utilizaron las diluciones 10^8 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , de las suspensiones bacterianas, de cada una de estas diluciones se añadió 100 μ l a tubos que contenían 5 ml de sangre periférica con EDTA, se añadió a cada tubo con la mezcla de sangre mas la dilución, 5 ml de agua estéril, se centrifugó a 3.500 rpm/10 min. Se desecho el sobrenadante y al sedimento se resuspendió con 1 ml de agua estéril, se transfirió 1 ml de esta mezcla a un eppendorf estéril, y se añadió 200 μ l de la solución G_1 (NaOH 2,5%, N-acetil cisteina al 1.5 M), se incubó por 10 min/100°C, se centrifugó a 12.000 rpm/5 min, se desecho el sobrenadante y se resuspendió el pelet con 500 μ l de la solución Tris 50mM, luego centrifugó a 12.000 rpm/5min.

Se desecho el sobrenadante y al precipitado se añadió 50 ul de agua estéril, se añadió 50 ul de cloroformo, y centrifugo a 14.000 rpm/5min, se alicuotó el sobrenadante a otro tubo eppendorf estéril sin tocar la interfase y guardó a -20°C.

5.2 Ensayo 2

De la misma manera que el ensayo anterior se realizaron las diluciones a partir de solución mas concentrada comparada con la escala de Mc Farland de 0.5 que equivale aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml proporcionado por INLASA para referencia bacteriológica y clínica, de cada dilución que contenía a la bacteria se añadió un volumen de 100 ul a 2.5 ml de sangre periférica, pero esta vez, cada muestra contenía 2.5 de EDTA- Guanidina, es decir una relación volumen/volumen.

Se alicuoto de la mezcla de sangre periférica con la dilución realizada de la bacteria, 200 ul a un eppendorf estéril e identificado, se incubo a 100°C por 10 min controlado por termómetro. Se añadió posteriormente fenol-cloroformo, en relación al volumen de la muestra sanguínea, es decir, volumen/volumen, en el eppendorf, se centrifugo a 12 000rpm/5min, se saco el sobrenadante a otro tubo y al remanente se añadió 150 ul de agua destilada estéril, centrifugar a 12 000 rpm/5min, se separó la fase acuosa y se añadió la anterior solución, Añadir 200 ul de cloroformo -alcohol isoamilico, centrifugar a 12.000rpm/3min, se recupero la fase acuosa a otro eppendorf, se añadió 400 ul de etanol absoluto frío y 20 ul de acetato de sodio a pH 4.8, Guardar a -20°C toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugo a 12 000rpm/10 min, se añadió 50 ul de etanol al 70%, centrifugar a 12 000rpm/10 min, decantar el sobrenadante, dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente, finalmente se recupero el sedimento en 20 ul de agua destilada estéril, y guardar a -20°C.

5.3 Ensayo 3

Se realizaron las diluciones, a partir de caldo BHI, inoculado con una cepa de *S. typhi*, para las diluciones se utilizó agua de peptona 0,1% en un volumen de 10 ml, se transfirió a un tubo 1 ml de la dilución preparada y a partir de este se realizaron las restantes diluciones, se hicieron diluciones 1/10.

Se utilizaron las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , de estas diluciones se contaminaron a 5 tubos que contenía 200 ul de EDTA y 5 ml de sangre periférica humana, con 1 ml de la dilución , y se procedió a la extracción de ADN, añadiendo 5 ml de agua estéril, centrifugando a 3.500rpm/10 min, desechar el sobrenadante, al remanente se resuspendió con 1 ml de agua estéril, se alicuotó de esta resuspensión 1 ml a un tubo eppendorf estéril, se añadió 200 ul de la solución G_1 (NaOH 2,5%, N-acetil cisteina al 1.5M), y se prosiguió con el protocolo del ensayo 1 a partir de esta solución.

5.4 Ensayo 4

De una cepa de *Salmonella typhi*, sembrada en medio XLD a 37°C por 24 Horas, se contaminó con una colonia a 5 ml de sangre periférica con 200 ul de EDTA, luego se añadió 5 ml de agua destilada estéril, se centrifugó a 3.500 rpm/10 min. Se desecho el sobrenadante y al sedimento se

resuspendió con 1 ml de agua estéril, se transfirió 1 ml de esta mezcla a un eppendorf estéril, y se añadió 200 ul de la solución G₁ (NaOH 2,5%, N-acetil cisteína al 1.5 M), se incubó por 10 min/100°C, se centrifugó a 12.000 rpm/5 min, se desecho el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 500 ul de la solución Tris 50mM, luego centrifugó a 12.000 rpm/5min.

Se desecho el sobrenadante y al precipitado se añadió 50 ul de agua estéril, se añadió 50 ul de cloroformo, y centrifugo a 14.000 rpm/5min, se alicuotó el sobrenadante a otro tubo eppendorf estéril sin tocar la interfase y guardó a -20°C.

K. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella typhi*

1. Obtención de la cepa control

La cepa de referencia serotipificada fue otorgada gentilmente por el Instituto Nacional de Laboratorio en Salud INLASA.

2. Siembra de la cepa control en medios de cultivos selectivos

La cepa serotipificada fue sembrada en medios de cultivo selectivos agar Salmonella- Shiguella (S-S), agar xilosa – lisina – desoxicolato (XLD), y posteriormente incubados a 37°C por 24 Hrs.

3. Pruebas Bioquímicas

Se realizaron las pruebas bioquímicas, aislando 1 colonia a partir del agar XLD y SS, se sembraron en agar TSI (agar hierro triple azúcar); LIA (Agar Lisina hierro), Caldo urea, SIM (Sulfuro Indol Motilidad), y finalmente agar Citrato de Simmons (Anexo 1).

RESULTADOS Y DISCUSION

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CULTIVO

1. CEPA DE REFERENCIA

La cepa de referencia de *Salmonella typhi*, serotipificada y obtenida del cepario del Instituto Nacional de Laboratorio en Salud (INLASA), fue sembrada en medios de cultivo selectivos diferenciales, pasando posteriormente a ser confirmada por pruebas bioquímicas. (Anexo 2)

Los resultados obtenidos a través de las pruebas bioquímicas nos dio la confirmación de la cepa de referencia identificada como *Salmonella*, utilizándola para la realización de esta investigación.

2. RECuento DEL NÚMERO DE BACTERIAS EN LAS DILUCIONES

Se partió de cultivos en fase logarítmica de *Salmonella typhi* sembrada en caldo BHI e incubada a 35° C durante 24 horas, al cabo de este tiempo obtuvimos una población de 10⁹ Bacterias.

TABLA 8. Determinación de las diluciones iniciales en relación a la correspondiente dilución de bacterias/mL

Correspondencia en diluciones 1/10 para cada tubo	Relación de bacterias /mL en cada dilución
10^9	10 = mas concentrada
10^8	$10^{-1} = 1$
10^7	$10^{-2} = 0,1$
10^6	$10^{-3} = 0,01$
10^5	$10^{-4} = 0,001$
10^4	$10^{-5} = 0,0001$
10^3	$10^{-6} = 0,00001$
10^2	$10^{-7} = 0,000001$
10	$10^{-8} = 0,0000001$

Para determinar el número de bacterias que existían en las diluciones utilizadas en la contaminación de sangre periférica, se realizaron recuentos en agar plate count (PCA), en la tabla 9 se muestra los resultados obtenidos del recuento de las placas de PCA.

TABLA 9. Relación del Número de colonias en cada una de las diluciones obtenidas del recuento en PCA.

Diluciones	colonias en 1ml
10^{-4}	5882
10^{-5}	1794
10^{-6}	130
10^{-7}	15
10^{-8}	3

En las placas de PCA después de la incubación por 48 horas a 35°C, se observó el crecimiento de dos tipos de colonias pequeñas y grandes

ambas de color blanquecino, que tenían la forma de gránulos de arroz, a cada colonia se realizaron pruebas bioquímicas confirmando a ambos tipos de colonias como *Salmonella typhi*.

Las colonias grandes se observó que crecían en la superficie del agar, mientras las colonias pequeñas crecieron dentro del agar, posiblemente, interrumpiendo el crecimiento de estas colonias.

Este recuento se realizó con el fin de determinar la cantidad de bacterias que se tendrían por 1 ml de la suspensión, teniendo en cuenta que se alicuotó 1 ml de la dilución infectando con esta misma cantidad a 5 ml de sangre periférica humana, determinando así, el número de bacterias

que se tendría en cada contaminación en sangre. Esto permitió contaminar las muestras de sangre con una población conocida.

Tomando en cuenta las diluciones y los recuentos de colonias determinamos que existe relación en el descenso de las diluciones y la cantidad de colonias encontradas en cada dilución, dando un coeficiente de correlación de 0.978 (Anexo 5).

B. OPTIMIZACION DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Salmonella typhi*

1. EXTRACCION DE LA CEPA DE REFERENCIA.

En las variantes utilizadas para la extracción de ADN de *Salmonella typhi*, las variantes A y B, no dieron buenos resultados una vez realizada la corrida electroforética no se observa ningún resultado en el gel de agarosa, esto puede deberse a que la extracción realizada no fue la debida y los volúmenes de las extracciones eran demasiado pequeños, por otro lado, puede deberse a que en las muestras había demasiadas proteínas.

La Variante C, donde utilizamos PBS, y las colonias de *Salmonella typhi*, en fase logarítmica, se obtuvo mejores resultados, en la realización de la electroforesis para verificar la existencia de ADN se obtuvo la presencia de manchas que podría ser el ADN de la bacteria, esto fue confirmado en la amplificación de ADN de la bacteria.

2. EXTRACCION DE ADN DE *Salmonella typhi* EN MUESTRAS A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA HUMANA

En la realización de los ensayos 1 y 2 (pag. 51 y 52) no se obtuvieron buenos resultados el problema podría radicar en las diluciones que se realizaron utilizando agua destilada estéril, siendo esta una solución hipotónica, lisando a la bacteria; al realizar las diluciones posiblemente no se llevaba a la bacteria hasta la última dilución. Por otro lado el volumen, al realizar las diluciones, era mínimo siendo este poco confiable para una

adecuada suspensión bacteriana y llegar a la población bacteriana deseada.

En el segundo ensayo, utilizando el anticoagulante EDTA - Guanidina, se realizó de la misma forma que en el primer ensayo, la realización de las diluciones, sin tomar en cuenta que la bacteria podría estar lisada y sin viabilidad dando un resultado nulo para la cuantificación por electroforesis en gel de agarosa.

Para el tercer ensayo, ya se tomaron en cuenta estos factores, y se trabajó con medios de conservación para las bacterias, tanto para la fase estacionaria de partida, que fue el caldo BHI, como para las suspensiones bacterianas diluidas, para ello la utilización de agua de peptona al 0.1% fue de mucha ayuda conservando a la bacteria viable y revivificándola para continuar el proceso.

Para evidenciar la existencia de ADN se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, obteniéndose resultados positivos con una cantidad apreciable de ADN que luego fue cuantificado por espectrofotometría.

Realizando de la misma manera las extracciones, en el cuarto ensayo obtuvimos resultados muy favorables mediante la observación de gel de agarosa utilizando una colonia para la contaminación en sangre periférica humana extraída, ya sea purificando la extracción los resultados fueron óptimos.

Se debe tomar en cuenta la realización de una óptima extracción de ADN ya que en este tipo de contaminaciones con líquidos biológicos, en este caso sangre periférica humana, contiene bastante cantidad de proteínas

y tomando en cuenta la interferencia de la hemoglobina para el PCR, la extracción de las muestras debe ser un paso fundamental y el mejor realizado para la obtención de resultados confiables obteniendo un ADN lo mas purificado posible.

3. CUANTIFICACION DE ADN DE *Salmonella typhi* POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para la realización de la cuantificación, se utilizaron cubetas de cuarzo con capacidad de 1 ml, realizando la lectura de las absorvancias a diferentes longitudes de onda, a 260 nm para determinar la cantidad de ADN obtenido de las extracciones, y la otra absorvancia a 280 nm para determinar la cantidad de proteínas que podrían causar algún tipo de interferencia en la realización del PCR.

En la tabla 10 se observan los resultados obtenidos de la medición por espectrofotometría

TABLA 10. Lectura de las absorbancias de la primera extracción a partir de sangre periférica

Población Bacteriana en diluciones	Lectura de las absorbancias a 260nm	Correspondencia de las absorbancias a [ug/ml]
10 ⁻⁴	0.0241	2.14*10 ⁻⁴
10 ⁻⁵	0.0121	1.21*10 ⁻⁴
10 ⁻⁷	0.0069	6.9*10 ⁻⁴
10 ⁻⁸	0.0008	8*10 ⁻⁴

En la tabla 10, se observa una menor cantidad de ADN, determinando que la extracción haya sido defectuosa, tomando en cuenta la cantidad de proteínas, en este ensayo no se realizaron purificaciones del ADN (Anexo 4), por la poca cantidad de ADN obtenido, determinando que a la solución mas diluida solamente se obtenía una concentración de ADN de 8*10⁻⁴ ug/mL.

En esta segunda medición de las absorbancias ya se tomaron en cuenta varios factores como ser la purificación del ADN extraído (Anexo 4), con etanol e hidratado con agua tridestilada, obteniendo resultados mostrados en la tabla 11.

Se realizó los cálculos de las absorbancias obtenidas y se las transformó a concentraciones en ug/ml, (Anexo 3), que se observa los resultados en la siguiente tabla.

TABLA 11. Determinación de las absorvancias en una segunda extracción de ADN de *Salmonella typhi*.

Población Bacteriana en diluciones	Lectura de las absorvancias a 260nm	Correspondencia de las absorvancias a [ug/ml]
10 ⁻⁵	0.0187	1.87*10 ⁻⁴
10 ⁻⁶	0.0170	1.70*10 ⁻⁴
10 ⁻⁷	0.0095	9.5*10 ⁻⁴
10 ⁻⁸	0.0082	8.2*10 ⁻⁴
10 ⁻⁹	0.0072	7.2*10 ⁻⁴
1 Colonia	0.0278	2.78*10 ⁻⁴

En esta tabla se observa la medición del ADN purificado en ug/ml, observando la obtención de una mayor cantidad de ADN extraído, tomando en cuenta que, en cada dilución la concentración de ADN va descendiendo en relación con las diluciones realizadas.

Del mismo modo se hizo la medición de la extracción de ADN, contaminando con una colonia de *Salmonella typhi* en 5 ml de sangre periférica humana, pero a esta extracción no se hizo ninguna purificación, comparando, con la extracción de la colonia purificada, se obtiene una mayor cantidad de ADN pero así mismo hay una importante cantidad de proteínas, esto puede deberse, a que en sangre periférica hay mayor cantidad de proteínas propias de este liquido biológico, por otro lado, el caldo BHI que fue el punto de partida, tenia bastantes nutrientes para el crecimiento de la bacteria pudiendo contaminarse con esas proteínas del medio de cultivo.

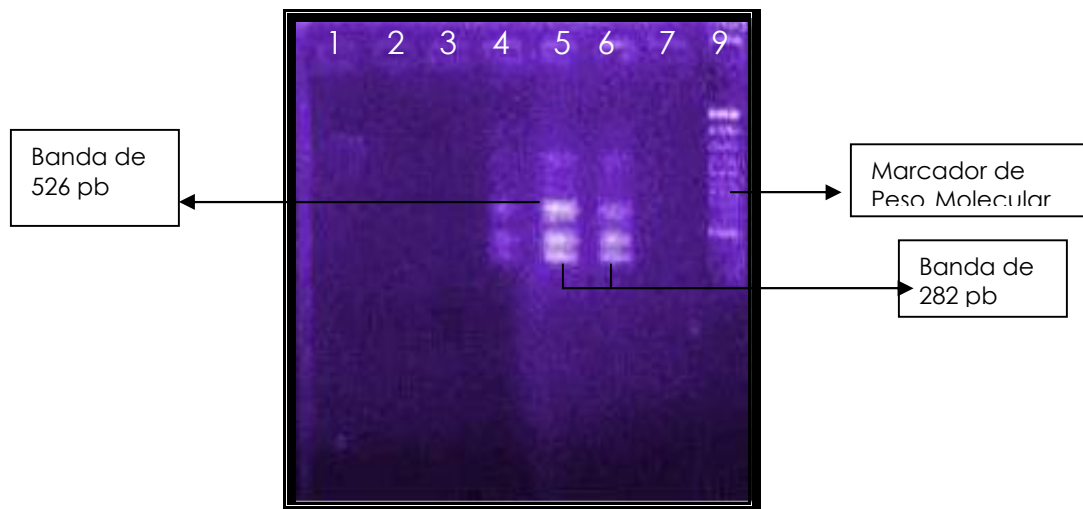
C. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA NESTED-PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella typhi*

1. OBTENCIÓN DE ADN EXTRAÍDO DE LA CEPA CONTROL DE *Salmonella typhi*.

Al concluir la técnica del Nested PCR en el termociclador Perkin Elmer 9600, se procedió al revelado de la amplificación obtenida de las muestras de ADN de *Salmonella typhi*, el revelado se realizó en el cuarto negro y se observó en el transiluminador de luz ultravioleta, dándonos como resultado bandas de 282 pb, estas bandas son el resultado de la amplificación de los cebadores BRSal 1A, y BRSal 1B, utilizadas en la segunda Etapa, por otro lado la formación de bandas con un peso molecular de 526 pb que son el resultado de la amplificación de los cebadores BRSal A, y BRSal B, utilizadas en la primera etapa.

En nuestros resultados se observa en la fotografía 1, los pozos 4, 5, 6, donde obtuvimos las bandas respectivas a 282 pb de *Salmonella typhi*, en el pocillo 7 se encuentra la extracción en medio BHI, en el pocillo 8 se encuentra el marcador de peso molecular. Obteniendo de la misma manera la banda de 526 pb.

FOTO 1. Fotografía de las controles positivos obtenidos de cepas puras de *Salmonella typhi*



Pocillo 1 se encuentra el control de agua del cuarto blanco, en el pocillo 2 control de agua del cuarto gris donde se realizaron las extracciones, el 3 pocillo corresponde a un control negativo, utilizando para este caso A DN de *Mycobacterium tuberculosis*.

2. OBTENCIÓN DEL ADN DE *Salmonella typhi* EXTRAIDA DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.

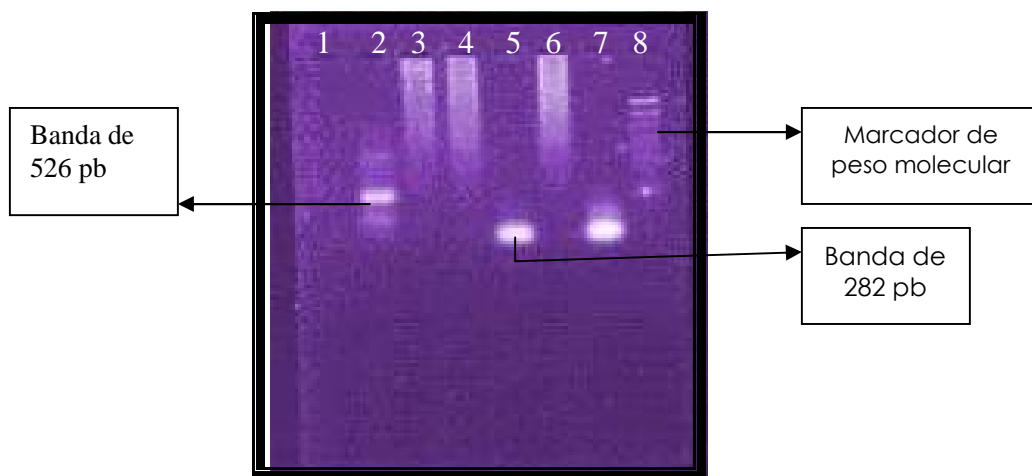
En los resultados obtenidos de la primera ampli ficación no se obtuvieron buenos resultados ya que pudo existir la inhibición de la reacción, posiblemente por la mayor cantidad de proteínas existentes en sangre como la hemoglobina de las muestras, para los siguientes PCR se tuvo en cuenta estos factores.

En la fotografía 2 se observa en el pocillo 2 la banda de 526 pb correspondiente a la ampli ficación del ADN extraído de 1 colonia sin

purificar, en los pocillos 5 y 7 las bandas de 282 pb, que corresponden a las diluciones 10^{-6} y 10^{-8} UFC, que son las muestras con una mayor dilución, en

los pocillos 3, 4, 6, se encuentran las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} , que se inhibieron posiblemente por la intervención de proteínas propias de la sangre como ser Hemoglobina que inhibe al PCR. El pocillo 8 se encuentra el marcador de peso molecular.

FOTO 2. Fotografía de las muestras de sangre periférica contaminadas con *Salmonella typhi*

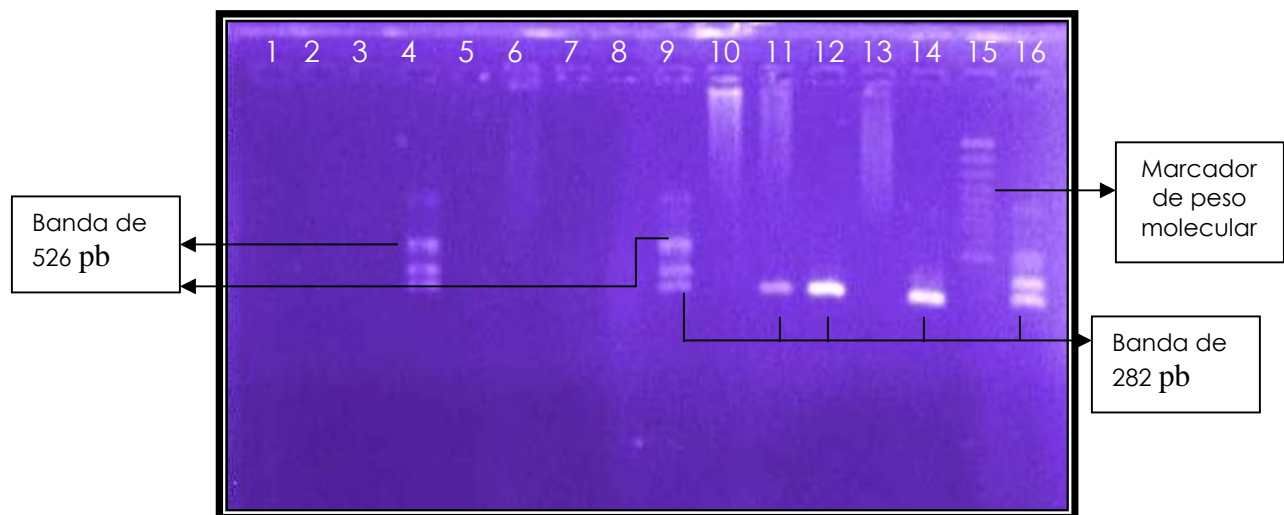


Pozo1 Control Negativo, pozo 2, 1 colonia, pozo 3, 4, 6 diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} , pozos 5, 7 diluciones 10^{-6} , 10^{-8} , pozo 8 marcador de peso molecular.

En la fotografía 3 se observan las muestras positivas de las diluciones, en los pocillos 1 y 2 se observa los controles de agua del cuarto blanco y del cuarto gris, en el pocillo 3 el control negativo, en el pocillo 4 el control positivo, en el pocillo 9 se observa la amplificación de una colonia sin purificar, en los pocillos 11, 12, y 14 las muestras purificadas correspondientes a las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , en el pocillo 16 se

encuentra la amplificación de una colonia purificada con etanol en el pocillo 15 se encuentra el Marcador de peso Molecular.

FOTO 3. Fotografía de las muestras obtenidas de la extracción de ADN de *Salmonella typhi* en muestras de sangre periférica purificadas con etanol.



Pozo 1,2 control de Agua del cuarto blanco y del cuarto gris, pozo 3 control negativo, pozo 4 control positivo, pozo 9 amplificación de una colonia sin purificar, Pozo 10, 13 diluciones 10^{-4} , 10^{-7} , pozos 11, 12, 14, diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , pozo 16 amplificación de una colonia purificada con etanol, pozo 15 Marcador de peso molecular.

En esta fotografía se observa que en los pocillos 5, 6, 7, 8, 10 y 13 no se observan bandas ya que, las muestras iniciales no se encontraban purificadas,(Anexo 4) por otro lado, esta ausencia puede deberse a una mala extracción de ADN de las muestras inhibiéndose por la mayor cantidad de proteínas presentes en sangre.

En la siguiente tabla se muestra la relación de muestras positivas con relación al número de bacterias obtenidas en cada una de las contaminaciones en sangre periférica humana.

TABLA 12. Resultado de las muestras contaminadas en relación a las diluciones realizadas y a la población bacteriana en 1 ml de las diluciones.

DILUCIONES	CORRESPONDENCIA EN LAS DILUCIONES	POBLACION BACTERIANA EN 1 ml	Nested-PCR <i>Salmonella typhi</i>
10 ⁻⁴	10 ⁵	5882	Inhibido
10 ⁻⁵	10 ⁴	1794	Positivo
10 ⁻⁶	10 ³	130	Positivo
10 ⁻⁷	10 ²	15	Inhibido
10 ⁻⁸	10	3	Positivo
1 colonia s/p	Sin Dilución	-----	Positivo
1 colonia purif	Sin Dilución	-----	Positivo

De los resultados obtenidos podemos indicar que en las diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁷, no dieron buenos resultados por la inhibición del PCR, ya sea por una mala extracción que se realizó, obteniendo una mayor cantidad de proteínas propias de sangre periférica como la hemoglobina.

De las muestras 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁸, la colonia s/p, y la colonia purificada se obtuvieron resultados óptimos para utilizar esta técnica Nested - PCR para la identificación de *Salmonella typhi* en muestras de sangre periférica humana.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

La realización de la investigación, permitió la identificación de *Salmonella typhi* en muestras sanguíneas mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa anidado (Nested - PCR), siendo esta una técnica molecular, determina un gen específico de la bacteria, comprobando exactamente el patógeno causante de fiebre tifoidea, utilizando para este fin Cebadores específicos para esta identificación.

El recuento de las colonias permitió determinar el número exacto de la población bacteriana que se encontraban en 1 ml de diferentes diluciones realizadas utilizando este mismo volumen para la contaminación en sangre periférica, teniendo la seguridad de haber realizado una contaminación *in vitro* de *Salmonella typhi*, en muestras sanguíneas.

En la optimización del método de extracción de ADN de *Salmonella typhi*, se utilizaron cepas confirmadas de la bacteria en estudio, ya que estas fueron serotipificadas por el Instituto Nacional de laboratorio en salud (INLASA), quienes nos proporcionaron la cepa de referencia, además se realizaron las correspondientes pruebas bioquímicas para la verificación de la bacteria en estudio, dándonos la confirmación para la utilización de esta, tanto para el control positivo como para la utilización de esta en las contaminaciones en sangre periférica a través de las diluciones realizadas en agua de peptona.

En la extracción del ADN, de la cepa control, como para las muestras sanguíneas, se debe tomar en cuenta la viabilidad y las condiciones de crecimiento de la bacteria, es decir, control de los medios de cultivo,

temperatura, tiempo de incubación, ya que desde el punto de vista bacteriológico se debe dar condiciones óptimas de crecimiento para la utilización y realización *in vitro* de este tipo de investigaciones, hasta el momento de la extracción o de la contaminación en muestras biológicas.

La técnica para la identificación molecular del ADN de *Salmonella typhi*, fue optimizada, demostrada por la presencia de bandas de 282 pb y 526 pb correspondientes a los Cebadores BRSal IA, BRSal IB, BRSal 1A, BRSal 1B, que amplifican la porción 1.8 kb del gen *Hin III* del AND cromosómico de *Salmonella typhi* determinando la presencia de ADN de la bacteria en muestras de sangre periférica.

Se debe tomar en cuenta que la presencia de bandas de 282 pb ya que esta confirma en gran medida la presencia de la bacteria en estudio, ya que la presencia de esta banda resulta de la amplificación de la primera epata evitando las reacciones cruzadas con otro tipo de Enterobacterias.

La sensibilidad de la técnica en comparación con otras técnicas convencionales, como el coprocultivo, hemocultivo, reacción de widal, etc, para la identificación de *Salmonella typhi*, llega hasta un 100% ya que la técnica identifico 1 bacteria en 5 ml de san gre periférica, por otro lado, debemos tomar en cuenta, la identificación de Bandas de 282 pb en la menor dilución de las extracciones nos dan a entender que la técnica es demasiado sensible como para detectar una cantidad menor de bacterias en esta dilución teniendo buenos resultados en la identificación de *Salmonella typhi*, en sangre periférica humana.

Se debe tomar en cuenta que en un primer ensayo que se realizó, se utilizó un solo Master Mix, utilizando los cuatro cebadores en un solo paso, este proceso se utilizó en los dos primeros ensayos, obteniendo, resultado muy poco confiables, esto puede deberse a que los cebadores de la primera etapa y la segunda etapa actúan a temperaturas similares siendo muy poca la diferencia entre las temperaturas en las que actúan los cebadores, de esta forma en la obtención de los resultados no se podría evidenciar la contaminación de otras Enterobacterias, ya que, en la segunda etapa con los cebadores BRSal 1A, BRSal 1B, evitan estas reacciones cruzadas para obtener mejores resultados e identificar a la bacteria patógena.

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

La utilización de esta técnica serviría, en gran medida, para un diagnóstico presuntivo, evitando futuras complicaciones e incluso hasta la muerte siendo esta una gran ayuda en el campo clínico.

Se debe tomar en cuenta, la forma de transmisión de esta bacteria y el estado inmunológico del paciente, el diagnóstico se podrá realizar de forma temprana, ya cuando el paciente curse los primeros síntomas de la enfermedad como dolor de cabeza, náuseas, estreñimiento, etc.

De la misma forma que para un hemocultivo la toma de muestra se recomienda que sea dentro de las tres primeras semanas después de la infección, pero la diferencia radica que en comparación con esta técnica, el Nested PCR tardaría menos de dos días para obtener los resultados requeridos.

Se debe tomar en cuenta que la extracción de ADN, es el paso fundamental para obtener buenos resultados teniendo necesariamente que realizar la misma, con las condiciones ineludibles de esterilidad.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. www.tuotromedico.com/temas/fiebre_tifoidea_Salmonelosis.htm#2
2. Jaime Saravia, M.D. SALMONELOSIS, Sección de Enfermedades Infecciosas Hospital San Juan de Dios. Actualizada el 30/04/2005.
www.aibarra.org/guias/default.html.
3. [www.worldwidevaccines.com/typhoid_sp/bacteria .asp](http://www.worldwidevaccines.com/typhoid_sp/bacteria.asp)
4. [www.biblioweb.dgsca.unam,mx/libros/microbios/index.html](http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html).
5. www.geocities.com/moralab/info.html
6. www.sns.gov.bo
Ministerio de Salud. "Informe Mensual de laboratorio de Fiebre tifoidea". Ámbito urbano/rural.2003
7. Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta® 2003. © 1993-2002 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
8. KONEMAN,E. " DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO". ED. Panamericana. ed. 5^{ta} Ed. Marzo 2001.
9. Miryam Margot Sanchez Jiménez. "Mecanismo de Interacción con la mucosa intestinal" Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Medellín Colombia. Asociación colombiana de infectología. Vol 7-1, 2003.
10. US5705332: Detección e Identificación de Salmonella y Shigella.

11. Mac Faddin, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 1990, ed. Panamericana
12. [www.Glosario-vocabulariobioquimica.biologiamolecular,N](http://www.Glosario-vocabulariobioquimica.biologiamolecular.N)
13. SANCHES. Rolando. "Guía de trabajos prácticos de biología Molecular", ed.1^{ra}, La Paz, Bolivia, 2003.
14. ALVAREZ M. JUAN, The MERCK MANUAL, Copyright, 1999 Ediciones Harcourt, S.A. Division iberoamericana.
15. E. Merck. Manual de medios de cultivo,1982
16. ESPINOZA A. EDY, "Identificación de *Salmonella sp* mediante la técnica Reacción en cadena de la Polimerasa anidado (Nested - PCR) y técnicas Convencionales en huevos de expendio en los principales mercados de la ciudad de La Paz", Tesis para optar a la Licenciatura en Bioquímica, La Paz, Bolivia, 2003
17. GUTIERREZ M. ERIKA, "Optimización de la extracción de ADN de Salmonella aislado a partir de coprocultivos del hospital de clínicas, La Paz, Bolivia 2002", Tesina para optar al título de licenciatura en Bioquímica.
18. RESSE Y BETT'S, "Enfermedades Infecciosas", ed.8^{va}. Ed. Marban libros S.L. Madrid España 2004.
19. HARRIS, EVA. "A low cost approach to PCR" , ED. Nazreen Kadir, New York Oxford 1998.

20. <http://www.unne.edu.ar/cyt/medicina/m-034.pdf>.
21. <http://www.fepafem.org/guias/tconten.html>
22. http://www.durviz.com/_Protocolos/BMolecular/Espanol/RBME01y02-Web.pdf
23. <http://www.unavarra.es/genmic/researchgroup/trabajos.findecarrera.html>
24. <http://www.infectio.org/v7n1/articulos.htm>

ANEXOS

ANEXO 1

La cepa de referencia de *Salmoenlla typhi*, fue aislada en medios de cultivo diferenciales como agar S-S, y Agar XLD, donde las colonias crecieron transparentes con el centro característico de color negro por la presencia de sulfuro de hidrógeno.

Posteriormente a esta colonia se sembró en medios de TSI, LIA, SIM, caldo Urea, Citrato, Voges Proscauer, incubándolos por 24 horas a 37°C obteniéndose lo siguiente:

TSI.- La bacteria dio lactosa negativo, por la coloración rojiza sin cambio de color en el medio, en la superficie inclinada, y Glucosa positivo mostrando un cambio de coloración del medio cambiando a amarillo Sulfuro de hidrógeno positivo, por la coloración negra que presentaba en el fondo del tubo.

Producción de gas negativo.

LIA.- Se observa que a está prueba la bacteria dio positivo por la presencia de la coloración púrpura del medio de cultivo por la descarboxilación del aminoácido lisina.

SIM.- Motilidad positiva, ya que en el medio presentaba la coloración negruzca se asume la motilidad de la bacteria.

Sulfuro de hidrógeno positivo, por la coloración negra.

Indol negativo, después de añadir el reactivo de Kovac, no se observa el anillo rojizo en la superficie del medio.

Caldo Urea.- Negativo, ya que no hubo ningún cambio en la coloración en el medio.

ANEXO 2

Descripción de los ambientes de trabajo en la Unidad de Biología molecular

Cuarto Blanco.- Este ambiente es de mayor esterilidad, ya que en este se realiza la preparación del Master Mix, en este cuarto se debe utilizar material totalmente nuevos y estos deberán ser irradiados con luz ultravioleta para evitar contaminaciones posteriores.

Cuarto Gris.- En este ambiente se realizan los trabajos que tengan que ver con cepas de bacterias, en este cuarto, se encuentran los termocicladores, Perkin Elmer 9600 y MY, para la realización del PCR.

En este ambiente para la realización de las extracciones de DNA necesariamente se debe utilizar material nuevo y estéril.

Cuarto Negro.- Este es el ambiente con más contaminación, de todas las áreas de la Unidad de Biología Molecular, en este ambiente se realizan la siembra de las muestras después del proceso del PCR, para realizar posteriormente, la electroforesis en gel de agarosa, y el revelado de la corrida en el transluminador de luz ultravioleta.

En este ambiente es importante la manipulación de todos los materiales estrictamente con guantes y un guardapolvo preciso para este ambiente.

ANEXO 3

Determinación de los cálculos realizados a partir de las densidades ópticas obtenidas a partir de las muestras contaminadas, con diferentes diluciones de la bacteria, a concentración de ug/ul.

La medición de la densidad óptica a 260 nm determina la cantidad de DNA que se encuentra en la muestra, la densidad óptica a 280 nm nos muestra la cantidad de proteínas que se encuentran en las extracciones realizadas, las fórmulas utilizadas son:

a) Transformación de las absorbancias a [ug/ul]

$$[\text{ug/ul}] = \text{D.O.}_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Fd}$$

$$[\text{ug/ul}] = \text{D.O.}_{280 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Fd}$$

Fd → Factor de dilución

b) Obtención de la calidad de DNA:

$$\text{Calidad de DNA} = \frac{\text{D.O.}_{260 \text{ nm}}}{\text{D.O.}_{280 \text{ nm}}}$$

ANEXO 4

Purificación de DNA.

La realización de purificación de las muestras de ADN, nos ayudo a obtener ADN sin contaminación y tratar de eliminar la mayor cantidad de proteínas existentes que podría interferir en la realización de la Reacción encadena de la Polimerasa Anidado (Nested- PCR).

A las extracciones de ADN se añadió etanol absoluto frío, la cantidad semejante a la que se tenía en el volumen de las muestras extraídas, posteriormente se centrifugo a 14.000 rpm/3 min, luego se deajo desecho el remanente de etanol absoluto, y el precipitado se deajo secar en el westen blott por 30 min a una temperatura de 50°C,.

Después de este tiempo, se procedió hidratar al ADN, añadiendo 1 ml de agua tridestilada, se resuspendió el ADN que se encontraba en el fondo del ependorf, con mondadientes estéril, y se guardó a - 20°C hasta el momento del procesamiento.

ANEXO 2

Descripción de los ambientes de trabajo en la Unidad de Biología molecular

Cuarto Blanco.- Este ambiente es de mayor esterilidad, ya que en este se realiza la preparación del Master Mix, en este cuarto se debe utilizar material totalmente nuevos y estos deberán ser irradiados con luz ultravioleta para evitar contaminaciones posteriores.

Cuarto Gris.- En este ambiente se realizan los trabajos que tengan que ver con cepas de bacterias, en este cuarto, se encuentran los termocicladores, Perkin Elmer 9600 y MY, para la realización del PCR.

En este ambiente para la realización de las extracciones de DNA necesariamente se debe utilizar material nuevo y estéril.

Cuarto Negro.- Este es el ambiente con más contaminación, de todas las áreas de la Unidad de Biología Molecular, en este ambiente se realizan la siembra de las muestras después del proceso del PCR, para realizar posteriormente, la electroforesis en gel de agarosa, y el revelado de la corrida en el transluminador de luz ultravioleta.

En este ambiente es importante la manipulación de todos los materiales estrictamente con guantes y un guardapolvo preciso para este ambiente.

ANEXO 3

Determinación de los cálculos realizados a partir de las densidades ópticas obtenidas a partir de las muestras contaminadas, con diferentes diluciones de la bacteria, a concentración de ug/ul.

La medición de la densidad óptica a 260 nm determina la cantidad de DNA que se encuentra en la muestra, la densidad óptica a 280 nm nos muestra la cantidad de proteínas que se encuentran en las extracciones realizadas, las fórmulas utilizadas son:

a) Transformación de las absorbancias a [ug/ul]

$$[\text{ug/ul}] = \text{D.O.}_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Fd}$$

$$[\text{ug/ul}] = \text{D.O.}_{280 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Fd}$$

Fd → Factor de dilución

b) Obtención de la calidad de DNA:

$$\text{Calidad de DNA} = \frac{\text{D.O.}_{260 \text{ nm}}}{\text{D.O.}_{280 \text{ nm}}}$$

ANEXO 4

Purificación de DNA.

La realización de purificación de las muestras de ADN, nos ayudo a obtener ADN sin contaminación y tratar de eliminar la mayor cantidad de proteínas existentes que podría interferir en la realización de la Reacción encadena de la Polimerasa Anidado (Nested- PCR).

A las extracciones de ADN se añadió etanol absoluto frío, la cantidad semejante a la que se tenía en el volumen de las muestras extraídas, posteriormente se centrifugo a 14.000 rpm/3 min, luego se deajo desecho el remanente de etanol absoluto, y el precipitado se deajo secar en el westen blott por 30 min a una temperatura de 50°C,.

Después de este tiempo, se procedió hidratar al ADN, añadiendo 1 ml de agua tridestilada, se resuspendió el ADN que se encontraba en el fondo del ependorf, con mondadientes estéril, y se guardó a - 20°C hasta el momento del procesamiento.