



III Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO- GFN)

**Diagnóstico de *Vibrio cholerae* y *Salmonella*
spp. por PCR**

Inversión de fase en *Salmonella* spp.

Año 2010

**SERVICIO ENTEROBACTERIAS
DEPARTAMENTO BACTERIOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
ANLIS "CARLOS G. MALBRAN"**

INDICE

I) FUNDAMENTOS Y VARIABLES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	3
II) IDENTIFICACIÓN DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> POR PCR	9
III) DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN ALIMENTOS POR PCR	31
IV) PROCEDIMIENTOS PARA LA INVERSIÓN DE FASE FLAGELAR EN <i>Salmonella</i> spp.	43
V) BIOSEGURIDAD	53

I) FUNDAMENTOS Y VARIABLES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El fundamento de esta técnica es imitar la replicación de ADN celular donde hay helicasas que producen la separación de las cadenas de ADN, seguida de una ARN polimerasa que sintetiza una secuencia corta de ARN o "primer". Luego, una ADN polimerasa reconoce estos oligonucleótidos y sintetiza las cadenas complementarias de ADN.

La técnica de PCR amplifica un fragmento de ADN, en forma exponencial, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable durante ciclos sucesivos donde se utiliza la desnaturalización por calor para separar las hebras de ADN. El segmento de ácidos nucleicos amplificado es específico ya que sus extremos son reconocidos por oligonucleótidos sintéticos diseñados especialmente que se unen a secuencias complementarias en el extremo 5' de cada hebra de ADN a amplificar (Persing D. 1993). Se utiliza como molde una muestra de ADN o ARN, que puede estar presente en un bajo número de copias.

A partir de la PCR se puede obtener distintos tipos de información, que básicamente se pueden resumir en: 1) presencia o ausencia de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos, y 2) distancia a la que se encuentran los cebadores o "primers" en el ADN templado.

ETAPAS DE LA PCR

Los ciclos de PCR consisten de tres etapas:

- Desnaturalización: se produce la separación de las hebras de ADN por calentamiento a 92 - 96 ° C. El tiempo va a depender del tamaño del fragmento y el contenido de G+C.
- Hibridación o "annealing": los "primers" se unen a los sitios complementarios en el ADN simple cadena a la temperatura óptima de hibridación (T_a). Esta depende de la composición de bases, el largo y la concentración de los "primers". La T_a ideal se encuentra generalmente 5°C por debajo de la verdadera temperatura de melting (T_m) de los "primers". La T_m es la temperatura a la cual el 50% de las cadenas primers-target se encuentra separadas en solución. El uso de una T_a inapropiada modifica la especificidad y sensibilidad de la reacción. El tiempo de annealing afecta la especificidad de la hibridación.
- Polimerización: luego del "annealing" de los primers se produce la extensión por acción de la polimerasa. Comenzando a partir del "primer" la enzima lee la hebra de templado e incorpora los nucleótidos complementarios. Se utiliza una ADN polimerasa termoestable que no se desnaturaliza por la alta temperatura y cuya

temperatura óptima de polimerización es 72° C. El tiempo de extensión depende de la concentración y del tamaño del fragmento a amplificar.

El número de ciclos utilizados depende del grado de especificidad y del grado de amplificación que se desee obtener, aconsejándose entre 25 y 35 ciclos.

Al final de los ciclos se realiza una extensión final que le da tiempo a la polimerasa para terminar todos los fragmentos para obtener bandas más definidas.

En los primeros ciclos se sintetizan productos de diferentes longitudes, recién a partir del cuarto ciclo se van acumulando los productos específicos del tamaño esperado, cuya longitud estará comprendida entre los dos sitios de unión a los “primers”. Después de 30 ciclos, donde en cada uno se duplica el número de moléculas de ADN, se obtienen del orden de 10^8 copias del ADN blanco. Hay que tener en cuenta que éste no es un proceso ilimitado ya que los reactivos utilizados en la reacción se agotan. Por otra parte, a medida que aumenta el número de copias del fragmento específico, es más frecuente el reannealing entre las cadenas complementarias del fragmento, que el annealing de los primers, por lo que también aumenta la hibridación no específica de éstos.

REACTIVOS NECESARIOS PARA REALIZAR LA PCR

- Buffer de enzima: Es necesario para la adecuada actividad enzimática. En general contiene Tris-HCl 20mM y 50mM KCl pH 8.3-8.9, aunque los fabricantes pueden modificar su composición para optimizar el rendimiento de la enzima. Lo importante es que se mantenga un pH alcalino a lo largo de la reacción ya que así se favorece la amplificación.
- Cloruro de Magnesio: es indispensable como cofactor de la enzima (Taq polimerasa) y afecta la hibridación entre cadenas de ADN tanto la interacción entre los “primers” y el templado como la estabilidad del ADN doble cadena. Por lo tanto, altas concentraciones disminuyen la especificidad y sensibilidad de la reacción y bajas concentraciones disminuyen la eficiencia de la reacción. Los rangos de concentración utilizados son de 1 -3 mM según cada protocolo.
- Desoxirribonucleótidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Deben ser agregados en iguales proporciones para minimizar falsas incorporaciones en la polimerización. Se debe ajustar la concentración para optimizar la especificidad y fidelidad de la reacción. Generalmente se utiliza una concentración de 200µM en el ensayo.
- Primers: preferentemente tienen entre 15 a 30 pb de longitud. No deben ser complementarios entre sí y deben tener similar contenido de G+C. No deben contener estructuras secundarias. Altas concentraciones disminuyen la

especificidad de la reacción y bajas concentraciones la eficiencia de amplificación. El rango de concentración en el ensayo varía desde 0.3 a 1 μM .

- Enzima ADN polimerasa: Se utiliza normalmente Taq polimerasa aislada de una bacteria termófila *Thermus aquaticus*, cuya temperatura óptima de extensión es 72°C. La enzima tiene una vida media de 40 minutos a 95°C, de manera que puede soportar aproximadamente hasta 40 ciclos repetitivos de PCR. El rango habitual en cada ensayo es de 0.5 - 2.5 U de enzima. A baja concentración disminuye el rendimiento de la reacción y a altas concentraciones genera productos inespecíficos. En la preparación de la mezcla de reacción, la enzima debe agregarse al final.
- Seroalbúmina bovina: Solamente se utiliza cuando el ADN templado corresponde a muestras con inhibidores (como agua de río, plancton). Se utiliza en concentraciones variables entre 10 y 600 ng/ μl y tiene la función de favorecer la actividad de la polimerasa, y por otro lado impedir que distintos tipos de compuestos inhiban la reacción de PCR, ya que tiene alta afinidad por compuestos fenólicos, proteínas y lípidos (Kreader, 1996).
- ADN blanco, la secuencia a amplificar debe contener desde < 0.1 a unas pocas kilobases. La cantidad total de ADN usado normalmente es de 0.05 a 1.0 μg . Lo que es realmente importante es la concentración molar del ADN, por lo que la cantidad a agregar depende del tamaño de las moléculas en el templado.
- Control negativo: se utiliza un tubo de reacción solo con reactivos, sin templado.
- Control positivo: se utiliza un templado de una cepa patrón o donde el perfil a amplificar sea conocido en ella.

Todos los reactivos deben ser conservados a -20°C.

PRECAUCIONES EN LA REALIZACIÓN DE LA PCR

Uno de los inconvenientes más importantes de esta técnica es la contaminación, ya sea de ADN proveniente del entorno, contaminación cruzada entre muestras de una misma reacción, o por el producto amplificado y contaminación por DNAsas.

Existen medidas de control para minimizar estos inconvenientes, para ello es necesario contar con distintas áreas dentro del laboratorio:

- Área de preparación de la mezcla de reacción (zona limpia)
- Área de manipulación de muestras, cultivo y extracción del ADN (zona semisucia)
- Área de amplificación y análisis del producto de la reacción (área contaminada)

En lo posible cada área debe tener dos entradas, circulación de aire para recontaminación de aerosoles y lámparas de luz UV. El movimiento de las muestras y

del personal tiene que ser de un área libre de amplicones hacia áreas contaminadas con ellos y nunca en sentido contrario. Es necesario que los reactivos se almacenen en áreas libres de contaminación, fraccionados en pequeñas alícuotas, y preferentemente que sean reactivos grado Biología Molecular. Hay que utilizar material nuevo y descartable, y prevenir la contaminación por aerosoles usando tips con filtro. Por las mismas razones es importante asignar los juegos de pipetas para cada área, como también descontaminar frecuentemente las mesadas, pipetas y equipos.

VARIANTES DE LA PCR

- PCR simple: se utiliza un solo par de “primers” y se obtiene un único fragmento.
- PCR-Multiplex: en la misma reacción de amplificación se utiliza más de 1 par de primers específicos para diferentes secuencias blanco. La coamplificación de diferentes targets sirve para distintos propósitos: escaneo de largas regiones de DNA, para incluir controles internos de amplificación, y principalmente para buscar simultáneamente diferentes patógenos o factores de virulencia presentes en la muestra. Esta variante tiene la ventaja de disminuir los costos y el tiempo de trabajo. Lo más crítico es optimizar la reacción tal que los diferentes fragmentos puedan ser amplificados en forma óptima en una sola reacción, principalmente los primers deben tener secuencias y Tm compatibles.

PROTOCOLO GENERAL DE PCR

Se prepara la mezcla de reactivos descritos anteriormente en la concentración óptima de cada uno, de acuerdo al número de muestras a analizar. Todos los reactivos deben permanecer en frío y mezclarse bien antes de dispensarlos. El procedimiento debe hacerse en un área limpia (libre de amplicones y cultivos) o cabina de flujo laminar. Se realiza la mezcla añadiendo primero los reactivos de mayor volumen y por último la enzima Taq polimerasa. Una vez homogenizada la mezcla, se fracciona en tubos de PCR. En otra área, se añade el ADN templado en cada tubo y luego se introducen los tubos en el termociclador. Es importante mantener los tubos en frío hasta el momento de introducirlos en el ciclador.

EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

Para realizar PCR es necesario contar con una muestra que contenga el ADN libre en solución, lo menos degradado posible, y con la menor cantidad de inhibidores de la amplificación.

Al partir de un aislamiento o cultivo puro, el ADN bacteriano se encuentra en altas concentraciones, y por lo tanto obtener ADN apto para PCR es sencillo, se deben lisar las células y separar el ADN, que es soluble en agua, de los detritos celulares.

Cuando el objetivo es estudiar bacterias presentes en muestras más complejas, como por ejemplo alimentos, materia fecal, sangre y muestras ambientales, la concentración de microorganismos es mucho menor, y por lo tanto la separación de ADN de interés mucho más compleja. Cuando se quieren estudiar microorganismos que son cultivables, la estrategia más simple es diluir la muestra en un medio de enriquecimiento (selectivo o no, de acuerdo al objetivo de la PCR) e incubar en las condiciones adecuadas para aumentar la concentración de las bacterias que se desea estudiar, y luego proceder a la lisis celular.

Pero existen casos en los que no se puede adoptar esta metodología: cuando los microorganismos no son cultivables; cuando se quiere estudiar la totalidad la comunidad microbiana, cuando el enriquecimiento no es posible para el microorganismo de interés. En estos casos, se debe extraer la totalidad del ADN bacteriano desde la muestra en estudio.

Básicamente toda extracción de ADN se puede separar en dos estrategias: purificar las células y luego extraer el ADN, o realizar una lisis dentro de la matriz y luego realizar la purificación del ADN. Esta última opción es la que permite la mayor recuperación, pero a su vez el templado tiene una mayor concentración de inhibidores (Miller, 1999).

Para extraer el ADN total se pueden adoptar alguna o varias de las siguientes alternativas:

- Disrupción física: uso de morteros, homogenizadores, sonicadores, perlas de vidrio, congelado - descongelado y hervido. Todas estas alternativas sirven para la lisis celular.
- Lisis química: mediante el uso de detergentes como SDS, lauril sarcosina, tritón X-100 para la romper la pared celular; uso de sales como NaCl para aumentar la osmolaridad; buffers Tris-ClH y PBS para mantener el pH entre 7 y 8; NaOH.
- Lisis enzimática: proteinasa K, lisozima, pronasa E y acromopeptidasa para lisis de la pared celular y degradación de proteínas.
- Extracción con solventes orgánicos: el uso de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico o cloroformo-isoamílico sirve para separar las proteínas presentes en la muestras, y para remover las enzimas utilizadas durante la extracción.
- Purificación del ADN con resinas o reactivos que tienen afinidad por el ADN o los componentes contaminantes: columnas de sílica, sephadex, sepharosa, resinas chelex, CTAB y otras alternativas comerciales.
- Precipitación del ADN con un alcohol: etanol o isopropanol.

No es necesario que la muestra conteniendo la secuencia a amplificar esté altamente purificada, aunque ciertas impurezas presentes en la muestra como ácidos húmicos, polifenoles, heparina, grupo hemo, Mg^{2+} , agentes quelantes, detergentes y metales pesados como el hierro inhiben la reacción de PCR.

II) IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO CHOLERAE* POR PCR

INTRODUCCIÓN

El cólera es una de las enfermedades infecciosas que se conocen de más larga data, existiendo reportes de esta patología desde 1817 (Colwell et al, 1996). El agente etiológico del cólera es *Vibrio cholerae*. Este bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y móvil, fue descrito por primera vez en 1854 por Pacini en Italia y en 1883 por Robert Koch. El cólera se ha manifestado como una enfermedad epidémica desde la antigüedad y las manifestaciones clínicas de la infección varían desde una infección asintomática hasta una diarrea severa. La patología en su forma más severa se caracteriza por una profusa diarrea acuosa (deposiciones como “agua de arroz”), vómitos y deshidratación con gran pérdida de sales y agua; si no es adecuadamente tratada podría desencadenarse un shock hipovolémico, acidosis metabólica, falla renal y la muerte. Estas manifestaciones clínicas fueron atribuidas a la presencia de la toxina de cólera (CT) en *Vibrio cholerae*, que fue demostrada en 1959 por científicos de la India (De SN, 1959). En 1987 se identificó un factor de virulencia adicional, implicado en la adherencia de *V. cholerae* a células intestinales que se denominó “toxin coregulated pilus” (TCP) (Taylor et al., 1987).

En base a diferencias en el antígeno somático “O”, *V. cholerae* ha sido clasificado en numerosos serogrupos, siendo reconocidos al menos 200 hasta el año 1997 (Yamai et al, 1997). De estos serogrupos, sólo el O1 y, más recientemente, el O139 (Kaper, 1995) han causado epidemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a serogrupos no-O1, no-O139, han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde diarrea leve hasta deshidratación severa semejante a cólera (Levine, 1988). Por otra parte, *Vibrio cholerae* no-O1 puede causar infecciones tales como: apendicitis aguda, colecistitis aguda, otitis media, celulitis, neumonía, meningoencefalitis y septicemia (Sanyal et al, 1992) Estas lesiones indicarían que estas cepas podrían tener propiedades invasivas en adición a su enterotoxicidad.

La mayoría de los aislamientos de serogrupos O1 y O139 producen CT y han sido asociados con el cólera epidémico, aunque se han aislado cepas de estos serogrupos que no producen dicha toxina y no estuvieron involucrados en epidemias (Faruque, 1998; Pichel, 2003).

Transmisión del cólera

La infección por *V. cholerae* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados consumidos crudos o insuficientemente cocidos. Uno de los tipos de alimento involucrados son los moluscos bivalvos que se contaminan en el medio marino. Las almejas, ostras, mejillones se suelen consumir crudos o con un tratamiento de calor mínimo, en los cuales, *V. cholerae* puede ser no sólo

contaminante de superficie, sino estar presentes en su tracto intestinal, ya que estas especies son filtradoras y concentran el microorganismo (Costagliola, 2000).

Ecología del cólera

V.cholerae es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, tanto en ríos, como en estuarios y en ambientes marinos. Tanto en áreas endémicas como epidémicas, los brotes de cólera siguen un patrón estacional, apareciendo de forma explosiva en varios focos simultáneamente, indicando un posible rol de factores ambientales en la aparición de las epidemias. El medio acuático ha sido reconocido como reservorio y vehículo para la transmisión de *V. cholerae* en numerosos estudios (Colwell, 1996).

Durante el curso de un brote, es posible aislar *V. cholerae* O1 de pacientes y de muestras ambientales. Así, se ha determinado la presencia del microorganismo en aguas superficiales, de río, estanque y pozo (Tamplin, 1991). Sin embargo, en los períodos inter-epidémicos no es posible recuperar *V. cholerae* O1 empleando los métodos de cultivo tradicionales. (Colwell, 2000). Rita Colwell y col han demostrado la existencia de la forma “durmiente” viable pero no cultivable (VNC) a la cual “entra” *V.cholerae* en respuesta a condiciones desfavorables de nutrientes y ambientales: baja concentración de nutrientes, temperatura, pH o salinidad distintos a los óptimos (Colwell ,1994). Se postula que las formas VNC explicarían la manera en que *V. cholerae* se mantiene en el ambiente durante los períodos inter-epidémicos. La asociación con el fito y zooplancton, en particular con copépodos, a través de la actividad quitinasa de *Vibrio cholerae*, facilitaría la sobrevivencia del microorganismo en el ambiente acuático, asegurando su persistencia por largo tiempo en condiciones adversas. El florecimiento de las distintas especies de plancton, relacionado a su vez con cambios climáticos, explicaría la estacionalidad de los brotes de cólera. En condiciones adecuadas, las formas VNC pueden revertir al estado cultivable, manifestando plenamente su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad.

Mecanismos de patogénesis de *Vibrio cholerae*

Los principales factores de virulencia asociados a cepas epidémicas O1 y O139, incluyen la enterotoxina (CT) y el factor de colonización (TCP), que confiere la habilidad de colonizar el intestino delgado. Este factor de colonización esencial, actúa además como receptor para el fago *ctxφ*, que contiene los genes para la síntesis de CT (Waldor, 1996). La proteína estructural de la fimbria TCP está codificada en el gen *tcpA*, que presenta alta variabilidad según lo descrito recientemente (Nandi et al, 2000). Esta hipervariabilidad en la superficie de la bacteria le permite escapar del reconocimiento por el sistema inmune del huésped.

Además de CT y TCP, otros factores de virulencia han sido identificados en aislamientos de *V. cholerae* como: hemolisinas, proteína reguladora (ToxR),

citotoxinas (RTX) y toxina termoestable (ST) entre otros. Por lo tanto el estudio de la distribución de los distintos genes asociados a virulencia en cepas de *V. cholerae* permite evaluar el potencial patogénico de las mismas. La toxina ST actúa estimulando la actividad de guanilato ciclasa, promoviendo la secreción de Cl⁻ y/o inhibiendo la absorción de Na⁺ y agua (Forte et al., 1992, Vicente A., 1997).

Emergencia de nuevas cepas toxigénicas

A nivel molecular, los principales genes patogénicos de *V. cholerae* se encuentran en regiones del cromosoma en forma de “clusters” o islas de patogenicidad, teniendo la capacidad de ser propagados horizontalmente (Karaolis et al. 1998, Heidelberg 2000). Esto sugiere que cepas ambientales pueden volverse más virulentas para el hombre a través de la adquisición de genes de patogenicidad.

Epidemiología del cólera en América

V. cholerae es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea en niños y adultos, particularmente en áreas donde el cólera es endémico. El cólera reemergió en América Latina en enero de 1991 (Levine, 1991), luego de 100 años, en forma de una explosiva epidemia que comenzó en Perú. Esta epidemia fue causada por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor. En Argentina, entre 1992 y 1998 ocurrieron siete brotes de cólera, principalmente en el norte del país, y en períodos estivales. En general en el continente Latinoamericano se presentan casos de cólera asociados a brotes epidémicos y que aún no pueden considerarse endémicos. En los últimos años, se registró una disminución en el número de casos, como también zonas libres de cólera en el continente Americano. Sin embargo, es importante sostener una continua vigilancia para prevenir futuros brotes, especialmente ante la evidencia de la presencia de reservorios de *V. cholerae* O1 viable no cultivable, según lo observado en el Río de la Plata y en la plataforma marina bonaerense (Binsztein 2004).

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CARACTERIZACIÓN DE *V. cholerae*

En el “Manual de procedimientos para el aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*”, de la Red WHO Global *Salmonella* Surveillance (actualmente Global Foodborne Infections Network) de América del Sur, editado en el año 2008, se describen los protocolos para el aislamiento a partir de muestras clínicas, la identificación y caracterización de *Vibrio cholerae* (<http://www.panalimentos.org/salmsurv>).

A modo de resumen, se presentan en las figuras 1 y 2 los esquemas para el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de materia fecal y de agua y, en las Tablas 1 y 2, las pruebas bioquímicas para la identificación de *V. cholerae* y su diferenciación con respecto a otras especies del género *Vibrio* spp.

Fig. 1 Flujograma de aislamiento de *V. cholerae* a partir de material fecal

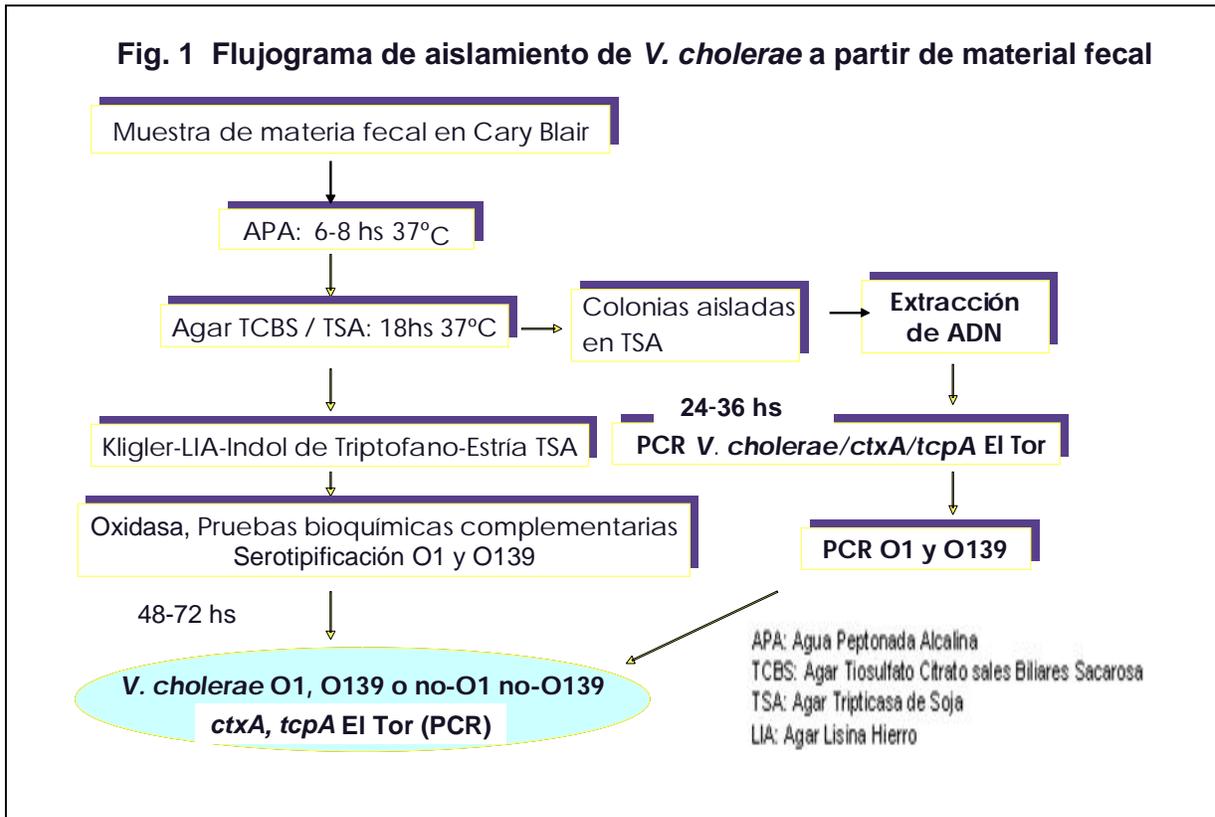


Fig. 2 Flujograma de aislamiento de *V.cholerae* a partir de agua

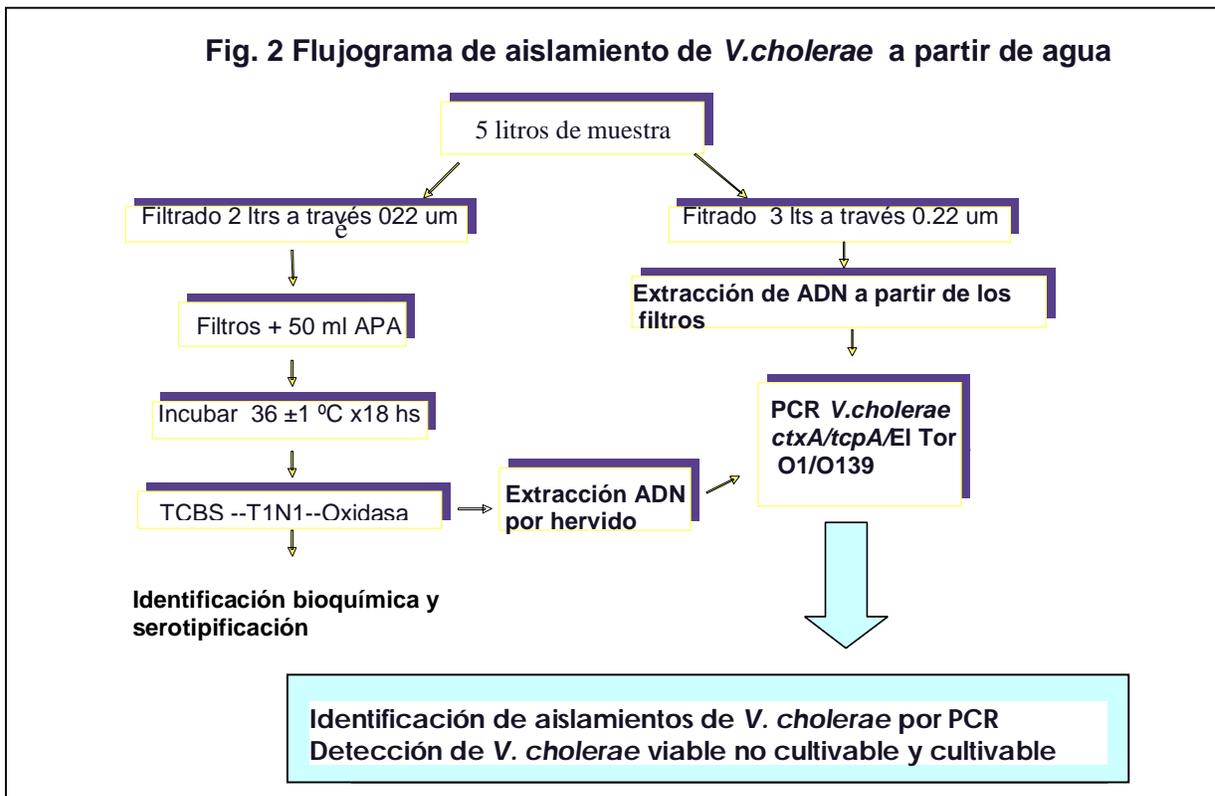


Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas para identificación de *Vibrio cholerae*

Prueba Bioquímica	Porcentaje de Positividad
Oxidasa	100
Kligler glucosa (ácido)	100
Kligler glucosa (gas)	0
Kligler lactosa (ácido)	7
Reacción del Indol	99
Lisina decarboxilasa (1% Na Cl)	99
Ornitina decarboxilasa (1% Na Cl)	99
Arginina dehidrolasa (1% Na Cl)	0
Rojo de metilo (1% NaCl)	99
Voges Proskauer (1% Na Cl)	75
Crecimiento en caldo nutritivo con 0% NaCl	100
Crecimiento en caldo nutritivo con 1% NaCl	100
Crecimiento en caldo nutritivo con 6% NaCl	53
Crecimiento en caldo nutritivo con 8% NaCl	1
Crecimiento en caldo nutritivo con 10% NaCl	0

Tabla 2. Características bioquímicas de especies de la Familia *Vibrionaceae* patogénicas para el hombre

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophila</i> **	<i>P. shigelloides</i> **
TCBS agar	Y	Y	Y	Y	NG	Y	G	G	G	Y	G
mCPC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
CC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA	KK	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Growth in (w/v):	0% NaCl	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6% NaCl	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-	-
	10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	V	-	nd	V	+	+	+	V	+
Acid from:	Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	V	-
	D-Cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	V	+	-
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-
	Arabinose	-	-	+	+	+	-	+	-	V	-
	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
	D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+
	ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	
Sensitivity to:	10 µg O/129	R	S	R	R	nd	S	S	R	S	S
	150 µg O/129	S	S	S	S	nd	S	S	S	S	S
	Gelatinase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	Urease	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-

* Adapted from Elliot *et al.* (31)

** *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*

PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE *V. CHOLERAE*

La aplicación de PCR en el diagnóstico de *V. cholerae* presenta numerosas ventajas, ya que permite:

- Identificar la presencia del microorganismo y/o sus genes asociados a virulencia en muestras clínicas, ambientales y de alimentos (agua, plancton, mejillones). Especialmente útil para detección de formas no cultivables y como tamizaje – screening rápido- en el flujograma de aislamiento de formas cultivables de *V. cholerae*.
- Caracterizar rápidamente aislamientos para: confirmar especie, determinar presencia de genes asociados a virulencia y genes que codifican los antígenos somáticos de los serogrupos epidémicos O1 y O139. La identificación de estos últimos genes por PCR es de particular utilidad para la resolución de cepas rugosas, autoaglutinantes o que presentan reacciones débiles con los antisueros.

Las etapas de aplicación de PCR para el aislamiento, identificación y detección de serogrupos O1 y O139 y genes asociados a virulencia *ctxA* (codifica la toxina de cólera) y *tcpA* alelo El Tor (codifica la proteína estructural de la fimbria TCP, alelo El Tor), se indican en las Fig. 1 y 2. Se describen en este manual los protocolos de procedimientos para realizar los ensayos de PCR correspondientes, a partir de muestras de agua y a partir de aislamientos de *V. cholerae*, para su identificación y caracterización.

Protocolos de procedimientos para la identificación y caracterización de *Vibrio cholerae* por PCR

Paso 1 - Extracción de ADN

1.1 – Extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano

Para la extracción rápida de ADN de *V. cholerae*, se toma a partir de un aislamiento en una placa de TSA, 3-4 colonias y se prepara una suspensión de 500 μ l en agua de calidad molecular en un microtubo de 1.5 ml. Esta suspensión es sometida a 100°C durante 10 min. Se deja enfriar y se realiza una breve centrifugación (1-2 m a 12000rpm) para precipitar los detritos celulares. Luego se trasvasan 200 μ l del sobrenadante donde se encuentra el ADN a un nuevo microtubo estéril, y éste se utiliza como templado de la reacción de PCR. Los templados así preparados pueden conservarse a -20°C. El mismo procedimiento debe realizarse con las cepas de referencia a utilizar como controles positivos.

Si se quiere estandarizar el inóculo, éste debe realizarse en solución fisiológica, para luego leer la densidad óptica de la solución a 620nm y ajustar a una DO= 0.3 para 500 μ l.

Los cálculos se realizan: $DO_i \times V_i = DO_f \times V_f$

Entonces: $DO \text{ leída} \times V_i = 0.3 \times 500 \mu\text{l}$

i: inicial; f: final

El volumen inicial (Vi) determinado es lo que se centrifuga y se resuspende en 500 µl de agua calidad molecular estéril, para continuar luego con los pasos de hervido y centrifugación detallados arriba.

1.2 - Extracción de ADN a partir de muestras de agua

La extracción de ADN total de muestras de agua, seguida de una amplificación por PCR de genes específicos es especialmente útil para detectar bacterias viables no cultivables.

La metodología descrita se basa en la extracción publicada por Rivera et al, 2003, con ligeras modificaciones:

Para preparar las muestras de agua hay dos opciones:

- Opción 1: Filtrar 3 litros de agua a través de membrana de policarbonato de 0.22 µm. Se lava dos veces con agua bufferada (todavía en el portafiltro). Se corta la membrana en pequeños pedazos asépticamente y se adicionan 1.8 ml de buffer SET.
- Opción 2: Filtrar 3 litros de agua a través de membrana de policarbonato de 0.22 µm. Se enjuagan con 6 ml de PBS y se recupera 1-2 ml de ese lavado. Luego se centrifuga 20 minutos este lavado a máxima velocidad y se resuspende el pellet en 1.8 ml de buffer SET.

En este punto las muestras se pueden congelar o se comienza con la lisis celular:

- Agregar 360 µl de lisozima 5 mg/ml, e incubar 45 min en baño a 37°C con agitación.
- Agregar 115 µl de SDS 10% y 25 µl de proteinasa K 20 mg/ml recientemente preparada, e incubar 1:30 hs en baño a 37°C con agitación.
- Agregar 400 µl de NaCl, vortexear la muestra y agregar 280 µl de CTAB- ClNa, y volver a vortexear. Ambas soluciones deben precalentarse a 65°C. Incubar 20 min a 65°C. Dejar enfriar en heladera.
- Agregar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (aprox 3 ml) y centrifugar 20 min a máx.velocidad.
- Trasvasar cuidadosamente la solución acuosa a otro tubo de polipropileno de 15 ml y agregar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico. Volver a centrifugar 20 min a máx.velocidad.
- Separar fase acuosa en un tubo de vidrio pequeño y precipitar el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol. Homogenizar levemente para formar un precipitado de ADN y transferir (si es visible) utilizando un capilar de vidrio a un tubo microtubo. Si no es posible visualizar el ADN, se recomienda centrifugar la solución a máxima velocidad durante 20 min en un microtubo de 2 ml.
- Lavar el pellet de ADN con 300 µl de etanol 70%, centrifugando 5 min.
- Dejar secando en la bomba de vacío.

- Una vez que los tubos están secos se resuspende el ADN con agua tridestilada, con un volumen que depende del pellet obtenido entre 25-100ul.
- Para medir la concentración y calidad del ADN se hace una lectura a 260, 280 y 320 nm. Se realiza con una dilución 1/100 de la muestra obtenida. La lectura a 260 nm me indica la concentración de ADN, la lectura a 280 nm refleja la concentración de proteínas. Se calcula la relación A260/A280, que debe dar entre 1 y 2 para indicar que la purificación del ADN fue eficiente. La 320 nm puede indicar una contaminación con ácidos húmicos, que por un lado interfiere con la lectura a 260 nm, pero también son inhibidores de la Taq polimerasa.

Paso 2 – Amplificación de secuencias específicas de especie, serogrupos O1 y O139 y genes de virulencia de *V. cholerae* por PCR

Se presentan en la Tabla 3 las secuencias de los primers utilizados en las reacciones de PCR:

Tabla 3. PRIMERS O CEBADORES

Primers	Secuencia de primers (5´- 3´)	Amplicon (pb)	Secuencia blanco - Referencia
VCO1-F2	5´ - CAACAGAATAGACTCAAGAA - 3´	647 (O1)	
VCO1-R2	5´ - TATCTTCTGATACTTTTCTAC - 3´		
VCO139-F2	5´- TTACCAGTCTACATTGCC - 3´	741 (O139)	O1/O139 (Multiplex- PCR Rivera et al, 2003)
VCO139-R2	5´- CGTTTCGGTAGTTTTTCTGG - 3´		
pVC-F2	5´- TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG - 3´	300	VC16S-23S rRNA (Chun et al, 1999)
pVCm-R1	5´- AGTCACTTAACCATAACAACCCG - 3´		
CT 94F	5´- CGCGCAGATTCTAGACCTCCTG - 3´	564	
CT 614R	5´- CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC - 3´		
TCP 72F	5´- CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG - 3´	451	ctxA- tcpA El Tor (Rivera et al, 2003)
TCP 477R	5´- CGAAAGCACCTTCTTTACGTTG - 3´		
<i>tcp</i> /132-F	5´- TAGCCTTAGTTCTCAGCAGGCA -3´	862	<i>tcp</i> (Rivera et al, 2001)
<i>tcp</i> /951-R	5´- GGCAATAGTGTGCGAGCTCGTTA -3´		

2.1 - Protocolos utilizando como templado ADN extraído de un cultivo bacteriano

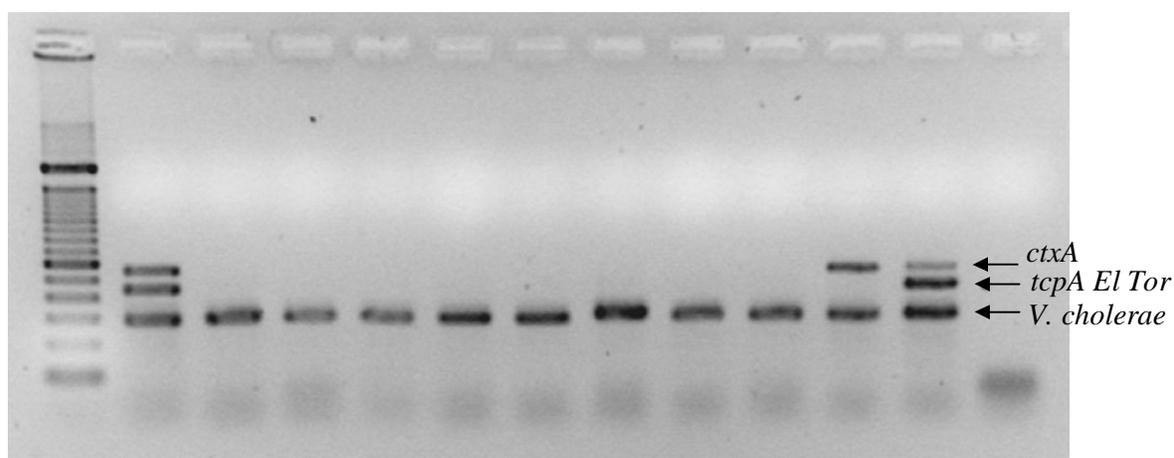
2.1.1 - PCR Multiplex para identificación y caracterización de *V. cholerae*: especie *V. cholerae* / toxina de cólera (CT)/ factor de colonización (TCP).

En esta reacción se amplifica un fragmento específico para *Vibrio cholerae*, correspondiente a una región del operón rRNA, de las regiones espaciadoras intergénicas (IRSs) localizadas entre 16S y 23S del rDNA (Chun et al, 1999). Para detectar la presencia de la toxina CT se amplifica un fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina. Por otro lado se amplifica un fragmento del gen *tcpA* que codifica para la proteína estructural (subunidad del pili), alelo específico del Biotipo El Tor, ya que esta proteína es polimórfica. En la Tabla 4 se presentan los componentes de la mezcla de reacción, condiciones de ciclado y tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

Tabla 4. PCR- Multiplex *V. cholerae* / *ctxA* / *tcpA*

Reactivos	Volumen (μ l)	Concentración
H ₂ O	9,25	
Buffer Tris-HCl 10X	2,5	1 X
Cl ₂ Mg 50mM	1	2 mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer VC-F2 10 μ M	2	0.8 μ M
primer VC-mR1 10 μ M	2	0.8 μ M
primer CT 94-F 10 μ M	1	0.4 μ M
primer CT 614-R 10 μ M	1	0.4 μ M
primer TCP 72-F	1	0.4 μ M
primer TCP 477-R	1	0.4 μ M
Taq DNA polimerasa 5U/ μ l	0,25	1.25 U
ADN	2	
Vol Final (μ l)	25	
Condiciones de ciclado		
Etapas 1-4	94°C	2 min
Etapas 2-4	94°C	45 seg
Etapas 3-4	60°C	45 seg
Etapas 4-5	72°C	45 seg
Etapas 5-6	72°C	10 min
Etapas 6	14 °C	
Gel de agarosa al 2 %		
Tamaño de fragmento	300 pb	Vc-m (16S-23S)
Esperado	451 pb	<i>tcpA</i> ElTor
	564 pb	<i>ctxA</i>

Fig. 3 PCR Multiplex *V. cholerae* / *ctxA* / *tcpA*



2.1.2 - PCR Multiplex para identificación de los genes que codifican los antígenos de *V. cholerae* O1 y O139 (serogrupos epidémicos).

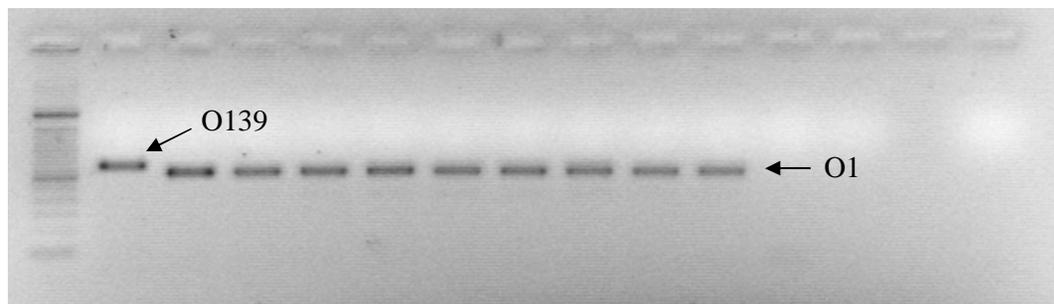
La biosíntesis del antígeno O en *V. cholerae* es controlado por los genes del locus *rfb*, de 22 kb para O1 y 35 kb para O139. La diferencia de secuencia de ADN entre los serogrupos está dada por una región específica para O139 de 13 kb., tal que con el uso de primers específicos se pueden definir claramente los diferentes serogrupos. Se implementó la reacción de PCR-multiplex para la determinación de los serogrupos O1 y O139 (Rivera et al, 2003). En la Tabla 5 se presentan los componentes de la mezcla de reacción, condiciones de ciclado y tamaño de los fragmentos de ADN amplificados

Tabla 5. PCR- Multiplex O1/O139

Reactivos	Volumen (μ l)	Concentración
H ₂ O dest.	13,6	
Buffer Tris-HCl-10X	2,5	1 X
Cl ₂ Mg 50mM	0,75	1.5 mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer VCO1-F2 10 μ M	1	0.4 μ M
primer VCO1-R2 10 μ M	1	0.4 μ M
primer VCO139-F2 10 μ M	1	0.4 μ M
primer VCO139-R210 μ M	1	0.4 μ M
Taq DNA pol. 5U/ μ l	0,15	0.75 U
ADN	2	
Vol Final (μ l)	25	
Condiciones de ciclado		
Etapa 1	94°C	2 min
Etapa 2	94°C	1 min
Etapa 3	52°C	1 min
Etapa 4	72°C	90 seg
Etapa 5	72°C	10 min
Etapa 6	14 °C	

Gel de agarosa al 2 %		
Tamaño de fragmento	647 pb	O1
esperado	741 pb	O139

Fig. 4 PCR Multiplex O1/O139



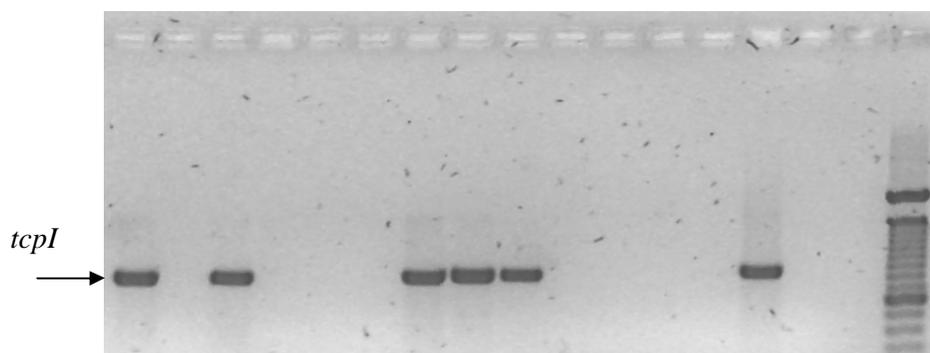
2.1.3 PCR para identificación del gen regulador *tcpI*

Dentro del operón que lleva los genes para la síntesis del factor de colonización TCP, el gen regulador *tcpI* está sometido a menor presión de selección que el gen estructural *tcpA*, por lo que tiene una variabilidad mucho menor. La detección de este gen es de especial utilidad como indicador de la presencia de TCP en cepas que tienen variantes del gen *tcpA* diferentes al alelo “EL Tor”. En la Tabla 6 se presentan los componentes de la mezcla de reacción, condiciones de ciclado y tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

Tabla 6. PCR para detección del gen *tcpI*

Reactivos	Volumen (μ l)	Concentración
H ₂ O dest.	13,63	
Buffer Tris-HCl-10X	2,5	1 X
Cl ₂ Mg 50mM	0,75	1.5 mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer <i>tcpI</i> 132-F	2	0.8 μ M
primer <i>tcpI</i> 951-R	2	0.8 μ M
Taq DNA polimerasa 5U/ μ l	0,125	0.6U
ADN	2	
Vol Final (μ l)	25	
Condiciones de ciclado		
Etapa 1	94°C	2 min
Etapa 2	94°C	1 min
Etapa 3	60°C	1 min
Etapa 4	72°C	2 min
Etapa 5	72°C	10 min
Etapa 6	14 °C	
Gel de agarosa al 1.5 %		
Tamaño de fragmento	862pb	<i>tcpI</i>
esperado		

Fig. 5 PCR para detección del gen *tcpI*



2.2 - Protocolos utilizando como templado ADN extraído de muestras de agua

Para este tipo de muestras, la mayoría de los reactivos utilizados coincide con los de la sección anterior, pero sus concentraciones se optimizan para mejorar la sensibilidad de la reacción. También se adiciona seroalbúmina bovina (BSA) para mejorar la efectividad de la técnica y evitar la acción de inhibidores, y se cambian las condiciones de ciclado ya que se parte de una concentración mucho menor de ADN. Es particularmente importante utilizar reactivos de la mejor calidad posible, como la enzima Go Taq Polimerasa (Promega), que fue incorporada al protocolo estandarizado que se describe, ya que es la polimerasa con mayor eficiencia entre las que se evaluaron en nuestro laboratorio.

Para estas muestras, se realiza primero una PCR para determinar la presencia de *V. cholerae* (identificación de especie). Las muestras positivas son estudiadas posteriormente para evaluar la presencia de los serogrupos O1 y O139 y de los genes de virulencia *ctxA* y *tcpA*.

2.2.1 - PCR para identificación de *V. cholerae* a partir de muestras de agua

Durante la estandarización y validación de la PCR para la detección directa de *V. cholerae* en muestras ambientales, se desarrolló un Control Interno de Amplificación (CIA), que permite descartar la posible presencia de inhibidores de la PCR (González Fraga, tesis doctoral). En la Tabla 7 se presentan los componentes de la mezcla de reacción, condiciones de ciclado y tamaño de los fragmentos de ADN amplificados para la PCR a partir de muestras de agua, utilizando el CIA.

Tabla 7. PCR *Vibrio cholerae* a partir de muestras de agua

Reactivos	Volumen (ul)	Concentración
H ₂ O dest.	8.8	
BSA 10 mg/ml	1	400 ng/ul
Buffer 5X (de enzima GoTaq)	5	
Cl ₂ Mg 25 mM	1*	2.5 mM final
Mix dNTP (2.5 mM)	2	0.2 mM
primer VC-F2 10µM	1.5	0.6 µM
primer VC-mR1 10µM	1.5	0.6 µM
GoTaq DNA pol. 5U/µl	0.2	1 U
ADN	3	
IAC (100 - 200 copias)	1	
Vol Final (µl)	25	

*sólo se agrega 1 ul de Cl₂Mg debido a que el buffer comercializado con la enzima Go Taq ya tiene entre sus componentes Cl₂Mg

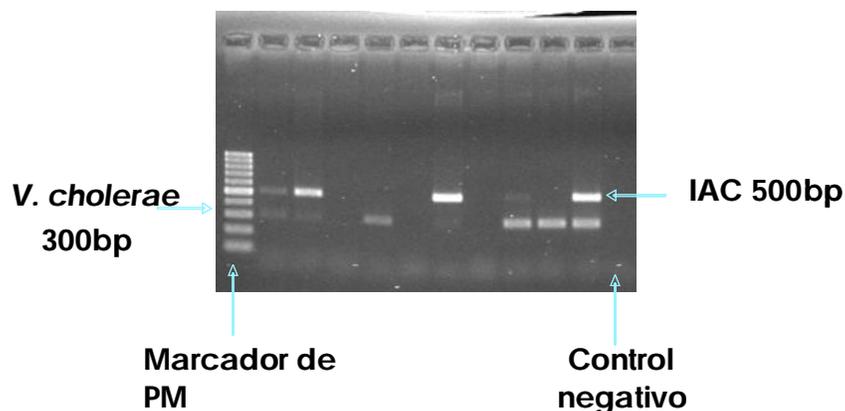
Condiciones de ciclado

Etapa 1	94°C	2 min	
Etapa 2	94°C	1 min	} 35ciclos
Etapa 3	55°C	1 min	
Etapa 4	72°C	1 min	
Etapa 5	72°C	10 min	
Etapa 6	14 °C		

Gel de agarosa al 1.5 %

Tamaño de fragmento esperado	300pb	Vc
------------------------------	--------------	----

Fig. 6. PCR *Vibrio cholerae* a partir de muestras



2.2.2 - PCR para identificación de *V. cholerae* O1 a partir de muestras de agua

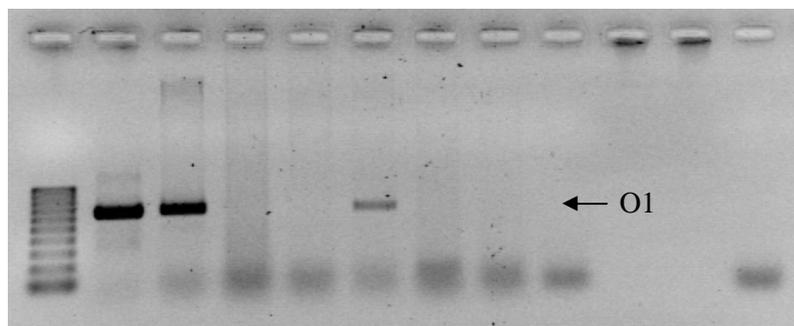
Esta reacción ha sido optimizada para la detección del serogrupo O1, responsable de las epidemias en América Latina. Si se desea identificar además el serogrupo O139 puede realizarse una PCR con los primers correspondientes y utilizando una temperatura de annealing de 55°C. En la Tabla 8 se presentan los componentes de la mezcla de reacción, condiciones de ciclado y tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

Tabla 8. PCR para detección de genes que codifican el serogrupo O1 a partir de muestras de agua

Reactivos	Volumen (ul)	Concentración
H ₂ O dest.	8.8	
BSA 5mg/ml	2	400 ng/ul
Buffer 5X (de enzima GoTaq)	5	
Cl ₂ Mg 25mM*	1	2.5 mM final
Mix dNTP (2.5 mM)	2	0.2 mM
primer VCO1-F2 10µM	1.5	0.6 µM
primer VCO1-R2 10µM	1.5	0.6 µM
Go Taq DNA pol. 5U/µl	0.2	1 U
ADN	3	
Vol Final (µl)	22	
Condiciones de ciclado		
Etapa 1	94°C	2 min
Etapa 2	94°C	1 min
Etapa 3	50°C	1 min
Etapa 4	72°C	1 min
Etapa 5	72°C	10 min
Etapa 6	14 °C	
Gel de agarosa al 1.5 %		
Tamaño de fragmento esperado	647 pb	O1

*sólo se agrega 1 ul de Cl₂Mg debido a que el buffer comercializado con la enzima Go Taq ya tiene entre sus componentes Cl₂Mg

Fig. 7 PCR *V. cholerae* serogrupo O1 a partir de muestras de agua



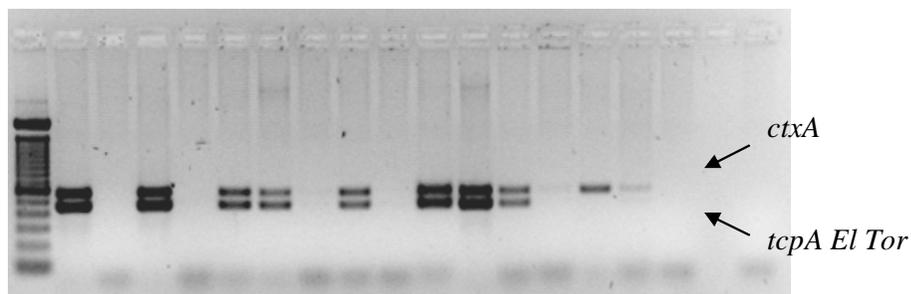
2.2.3 - PCR para identificación de *ctxA* (toxina CT)/ y *tcpA* (TCP) a partir de muestras de agua

En la Tabla 9 se presentan los componentes de la mezcla de reacción, condiciones de ciclado y tamaño de los fragmentos de ADN amplificados para la detección de estos genes asociados a virulencia en muestras de agua.

Tabla 9. PCR- Multiplex *ctxA* / *tcpA* con Go Taq

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración
H ₂ O dest.	7.8	
BSA 5mg/ml	2	400 ng/ul
Buffer 5X (de la enzima Go Taq)	5	1 X
Cl ₂ Mg 25 mM*	1	2.5 mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer CT 94-F 10uM	1	0.4 µM
primer CT 614-R 10 uM	1	0.4 µM
primer TCP 72-F	1	0.4 µM
primer TCP 477-R	1	0.4 µM
Go Taq DNA pol. 5U/µl	0,2	1 U
ADN	2	
Vol Final (µl)	25	
Condiciones de ciclado		
Etapa 1	94°C	2 min
Etapa 2	94°C	1 min
Etapa 3	60°C	1 min
Etapa 4	72°C	1 min
Etapa 5	72°C	10 min
Etapa 6	14 °C	
Gel de agarosa al 2 %		
Tamaño de fragmento esperado	451 pb	<i>tcpA</i> El Tor
	564 pb	<i>ctxA</i>

Fig. 8. PCR- Multiplex *ctxA* / *tcpA* a partir de muestras de agua



Paso 3 - Detección de los productos de PCR

- Gel de Agarosa

Para preparar el gel, se pesa la agarosa según el porcentaje y el tamaño del gel que se desea preparar, se agrega el volumen de buffer TAE 1X correspondiente y se funde en el horno microondas a 40% de potencia. La concentración de agarosa (0.7-2%) se calcula en función del tamaño de los fragmentos, tal que para fragmentos de bajo peso molecular se empleará la mayor concentración y viceversa. (En las tablas 4 a 9 se especifica la concentración adecuada para cada corrida electroforética). La agarosa fundida se coloca en el soporte armado con su peine, que es retirado una vez solidificado el gel.

- Electroforesis

Una vez solidificado el gel, se coloca en la cuba electroforética que contiene suficiente cantidad de buffer TAE 1X de tal modo que el gel quede cubierto. Se mezcla el buffer de siembra con la muestra en una proporción de 1 parte y 5 partes respectivamente, y se cargan 10-20µl de cada dilución por pocillo. Se siembra también el marcador de peso molecular. A la par de las muestras, se siembran el control positivo y el control negativo. Se conecta la cuba a la fuente de poder teniendo la precaución de que la línea de siembra se encuentre en el polo negativo ya que las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo. Las condiciones de la corrida electroforética recomendadas para los protocolos de PCR descritos son 100 voltios durante 30 minutos.

- Tinción del gel

Finalizada la corrida electroforética se procede a la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio en una concentración de 1µg/ml durante 30 minutos. Luego se enjuaga el gel en agua destilada.

Precaución: el bromuro de etidio es un reactivo cancerígeno por lo cual debe manipularse con extremo cuidado y el operador debe estar protegido con guantes.

- Observación de los fragmentos

El gel teñido es colocado en el transiluminador de UV que permite la visualización de las bandas de las diferentes muestras. Comparando la distancia recorrida de los fragmentos obtenidos de las muestras con el marcador de peso molecular se puede estimar el tamaño de los fragmentos. Para documentar esta reacción puede obtenerse una fotografía.

REFERENCIAS

- Binsztein N., Costagliola M., Pichel M., Jurquiza V., Ramírez, F., Akselman, R., Vacchino M., Huq A. and Colwell R. 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7481-7486.
- Colwell R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. Science, 1996, 274: 2025-2031.
- Colwell RR, Grimes J. Semantics and strategies. Non-culturable microorganisms in the environment. Ed. Colwell RR and Grimes J, American Society for Microbiology Press, Washington D.C.,2000:p 1-6.
- Colwell RR, Huq A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. En *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Ed. Wachsmuth K, Blake P, and Olsvik O. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1994,p:117-133.
- Costagliola M., Malaspina A., Guerrero R., Ma D., Odizzio M., Abelenda A., De Kereki C. Estudio de la presencia de *Vibrio cholerae* en la Zona Común de Pesca Argentina-Uruguay. Periodo 1992-1996. Frente Marítimo, 2000; 18: 53-58.
- Faruque S., Albert J. and Mekalanos J. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998; 62: 1301-1314.
- Forte L., Thorne P., Eber S. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat stable enterotoxin activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. Am. J. Physiol.,1992; 263: 607-615.
- Heidelberg J. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature, 2000; 406: 477-483.
- Kaper J. B., Morris J. G. Jr. Levine M. M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev., 1995, 8: 48-86
- Karaolis D. And Kaper J. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements of *Vibrio Cholerae*. Ed. Kaper J and Hacker J. Washington, 1999; Cap 9: 167-188.
- Levine M., Kaper J. B., Herrington D., Losonsky G., Morris J.G., Clements M. L., Black R. E., Tall B. and Hall R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. Infect. Immun. 1988, 56: 161-67
- Levine M., South America: the return of cholerae, Lancet, 1991; 338: 45-46.
- Miller D. N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. App. Environ. Microbiol. 65: 4715 – 4724.
- Nandi B., Nandy R., Vicente A., and Ghose A. Molecular Characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic Non-O1/ Non-O139 Strain of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun., 2000, 68: 948-952.
- Persing D., Smith T., Tenover F. and White T. En Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.Ed., 1993. Part I ; 51-104.

- Pichel M, Rivas M, Martin F, Ibarra C Binsztein N. Genetic diversity and emergence of a new variant of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Argentina. J Clin Microbiol, 2003; 41:124-134.
- Rivera I.,Chun J.,Huq A.,Sack R, and Colwell R. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. App. Environm. Microbiol., 2001; 67: 2421-2429.
- Rivera I., Lipp E., Gil A., Choopun N., Huq A., and Colwell R. Method for extraction and application of Multiplex PCR to detect Toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environm. Microbiol., 2003; 5: 599-606.
- Sanyal S. Epidemiology and Pathogenicity of Non-O1 Vibrio Species and related Organisms. Current Topics in Infectious Disease. Cholera. Ed. Barua D., Grwnnough III W.,N York 1992; Cap 3 : 57-67.
- Tamplin M., Carrillo P. Environmental spread of *Vibrio cholerae* in Perú. Lancet, 1991; 338:1216-17.
- Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., Mekalanos J.J. 1987. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor co-ordinately regulated with cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 2833-2837.
- Vicente A., Cohelo A and Salles C. Detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* heat-stable toxin gene sequence by PCR. 1997; 46: 398-402.
- Waldor M.K. Mekalanos. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 1996, 272: 1910- 1914.
- Yamai S., Okitsu T., Shimada T. Katsube Y. Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non -O1 non- O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. Jpn. J. Assoc. Infect. Dis.,1997; 71:1037-1045.

ANEXO I – *V. cholerae*

Soluciones

- **Buffer SET (Sacarosa, EDTA y Tris-CIH)**
Preparado con 20% de sacarosa, 50 mM de EDTA y 50 mM de Tris-CIH pH 8.
- **Solución stock de Tris-CIH 1M, pH 8.0**
Pesar 121.1g de Tris base y disolver en 800 ml de agua tridestilada. El pH debe ser ajustado con adición de ácido clorhídrico para pH 8.0 y completar el volumen ajustado a 1L de agua destilada.
- **Solución stock de EDTA 0.5M, pH 8.0**
Pesar 186.1g de sal sódica de EDTA y disolverlo en 800 ml de agua tridestilada con ayuda de un agitador magnético. El pH debe ser ajustado con NaOH 10N, y finalmente el volumen completado a 1 L.
- **Solución stock de NaCl 5M**
Disolver 292.2 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada con ayuda de un agitador magnético y placa caliente.
- **Solución de Lisozima**
Concentración de 5 mg/ml en 10mM TrisCIH, pH 8.0, 1 mM EDTA y 10 mM NaCl.
- **Proteinasa K**
Concentración de 20 mg/ml en agua tridestilada
- **Solución de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB 10%)**
Pesar 4.1g de NaCl en 80 ml de agua tridestilada, y agregar 10 g de CTAB. Disolver con agitación y calor. Ajustar a 100 ml.
- **Buffer Tris-Acetato (TAE) 50X**
Para 250 ml pesar 60.5 g Tris base y disolver por agitación en 150 ml de agua tridestilada. Adicionar 14.2 ml de ácido acético glacial y 25 ml de una solución 0.5M EDTA pH 8.0. Agregar agua tridestilada hasta completar 250 ml. Homogenizar y autoclavar. Se conserva a temperatura ambiente
- **Buffer de Siembra 6X**
Xileno cianol ó Azul de bromofenol 0.25% (P/V)
Glicerol 30% (V/V)
Agua destilada estéril. Conservar a 4°C
- **Solución de bromuro de etidio**
A partir de una solución stock de 10 mg/ml se realiza una dilución 1/10,000 para obtener una concentración final de 1µg/ml.
Para 1 litro se agregan 100µl de la solución stock. Esta solución se conserva a temperatura ambiente a resguardo de la luz.
- **Decontaminación de la solución de bromuro de etidio**
Para decontaminar la solución se agregan 200 mg de carbón activado cada 100 ml de solución de bromuro de etidio. Dejar 24 hs a temperatura ambiente con agitación intermitente. Filtrar con papel de filtro Whatman N° 1 y descartar el filtrado y eliminar el filtro y el carbón remanente en envases para residuos patológicos.

ANEXO II – *V. cholerae*

INSUMOS NECESARIOS PARA EXTRACCIONES DE ADN Y PCR

Material y equipamiento para extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano

- **Reactivos**
 - Agar tripticasa soja
 - Agua Calidad Biología Molecular estéril

- **Insumos descartables**
 - Placas de Petri
 - Cubetas para espectrofotómetro
 - Tips estériles (200 y 1000 μ l)
 - Microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml
 - Hisopos, escarbidentes o ansas plásticas estériles.
 - Guantes de látex

- **Equipos**
 - Micropipetas de 1000 μ l
 - Estufa de 37°C
 - Espectrofotómetro
 - Bloque Térmico o baño a 100°C
 - Microcentrífuga
 - Pipetas para 100ul y 1000ul (común de la mesada)
 - Mechero

Material y equipamiento para extracción de ADN a partir de muestras de agua y plancton

- **Reactivos**
 - Agua Calidad Biología Molecular estéril
 - Buffer SET
 - Lisozima
 - SDS 10%
 - Proteinasa K 20 mg/ml
 - NaCl 5M
 - CTAB-NaCl 10%
 - Fenol-Cloroformo-Isoamílico
 - Cloroformo
 - Alcohol Isoamílico
 - Isopropanol
 - Etanol 70%

- **Insumos descartables**
 - Congeladora con hielo
 - Tips amarillos y azules estériles
 - Tubos falcon 15 ml de polipropileno con tapa a rosca
 - Tubos de vidrio 13x100 para precipitar DNA
 - Microtubos de 2 ml (resistentes) estériles para centrífuga
 - Pipetas Pasteur estériles 3ml
 - Papel absorbente
 - Guantes de látex

ANEXO II – *V. cholerae* (cont.)

▪ Equipos

- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 ml
- Microcentrífuga
- Pipetas 0.5-10, 5-40 40-200 y P1000
- Homogenizadores (1)
- Gradilla para homogenizadores
- Gradillas
- 2 Baños con agitación (37°C y 65°C)
- Vortex
- Cámara de extracción de químicos
- Cámara de vacío/ desecador
- Espectrofotómetro
- Cubeta de cuarzo
- Heladera y freezer
- Pipetas de vidrio de 10ml (varias) y 2 de 25ml estériles
- Recipientes de vidrio para descartar pipetas

Reactivos e insumos para PCR

▪ Reactivos

- Agua Calidad Biología Molecular estéril
- Buffer de la enzima, incluido en el equipo comercial de la enzima
- Cloruro de magnesio, incluido en el equipo comercial de la enzima
- Primers o cebadores: Se reconstituyen con agua tridestilada o buffer TE (Tris-EDTA) según la recomendación del fabricante para obtener una concentración de 100 μ M. Se realiza una dilución 1/10 para obtener la solución de trabajo (10 μ M).
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Se prepara una mezcla de los cuatro dNTPs juntos en concentración final de 2.5mM para cada uno.
- Enzima polimerasa termoestable (Taq DNA polimerasa) de origen comercial
- Seroalbúmina bovina (BSA). Se prepara una solución 5 mg/ml que se esteriliza por filtración.
- Muestra: ADN templado

• Insumos descartables

- Microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml.
- Tubos para reacción de PCR de 0.2 ml nuevos, libres de DNAsas.
- Tips de barrera ART (aerosol resistant tips)
- Bloque térmico refrigerado o hielo
- Guantes de látex
-

• Equipos

- Termociclador
- Cabina de bioseguridad (área limpia)
- Micropipetas (10 μ l, 100 μ l, 200 μ l y 1000 μ l)
- Pipeta para cargar ADN 10 μ l

ANEXO II – *V. cholerae* (cont.)

Detección de los productos de PCR

- Reactivos
 - Agarosa
 - Buffer TAE 1 X
 - Buffer de siembra 6X (xilene-cyanol o azul de bromofenol)
 - Marcador de peso molecular de 100pb.
 - Bromuro de etidio
 - Agua destilada

- Insumos descartables
 - Probetas de 50 y 1000 ml
 - Erlenmeyers
 - Tips

- Equipos
 - Micropipetas de 20µl
 - Balanza
 - Horno microondas o equivalente
 - Cubas electroforéticas y accesorios
 - Fuente de poder
 - Transiluminador UV
 - Cámara fotográfica

III) DETECCION DE *SALMONELLA* SPP. EN ALIMENTOS POR PCR

INTRODUCCION

Salmonella spp. es un importante agente contaminante de alimentos. La contaminación de alimentos por el microorganismo representa un problema serio para la salud pública en todo el mundo. La bacteria se transmite a los humanos a través del consumo de carnes, huevos y productos lácteos contaminados. El riesgo de adquirir la infección depende de la sensibilidad del huésped y de la dosis infectiva que es del orden de 1000 células.

El control de los alimentos es una necesidad imperiosa tanto en el alimento terminado como en cada uno de los ingredientes que forman parte del alimento final. El control estricto de la calidad de los alimentos ha hecho que la incidencia de la salmonellosis disminuyera, pero los brotes todavía son frecuentes. Esto llevó a la necesidad de conocer en forma rápida la probable contaminación de los alimentos por este microorganismo.

Salmonella spp. es un organismo con algunas características particulares; no es resistente al calor y no crece a baja temperatura, pero sorprendentemente no se elimina por congelamiento. Puede sobrevivir en alimentos ácidos y resiste la deshidratación. Por lo tanto a pesar que no se puede multiplicar en muchos alimentos procesados, cuando la contaminación está presente, es muy difícil de erradicar. Por ejemplo, los alimentos grasos pueden proteger a las células de tratamientos térmicos severos haciendo que la pasteurización no sea efectiva.

El estudio epidemiológico de los brotes mas importantes indica que los alimentos más frecuentemente involucrados son los productos son carne, huevos y alimentos lácteos. Otros alimentos e ingredientes que requieren análisis de rutina son confituras con chocolate, hierbas y especias, ensaladas crudas, frutas, frutas secas, harina y productos marinos. También se pueden analizar carcasas de animales en el matadero. Las muestras a analizar se deben refrigerar si no se pueden enviar inmediatamente para su análisis.

Algunos alimentos deshidratados, especialmente hierbas y especias contienen compuestos que pueden inhibir el desarrollo de *Salmonella* spp. en los medios de enriquecimiento. Estos compuestos se deben neutralizar ya sea por el agregado de un agente neutralizante apropiado o por diluciones sucesivas.

Los métodos tradicionales reconocidos por los organismos oficiales para la identificación de *Salmonella* spp., tienen alta sensibilidad pero demandan una gran cantidad de tiempo hasta llegar al diagnóstico porque requieren el aislamiento de colonias sospechosas y su confirmación por pruebas bioquímicas y de serotipificación. En los procesos de producción y control de alimentos, la duración del procedimiento del diagnóstico constituye un factor

crítico, por el costo económico asociado que representa el retardo en la liberación de partidas de alimento para su comercialización, sobre todo en productos perecederos con cortos períodos de aptitud. Por otra parte, en el ámbito de la Salud, disponer de un método de diagnóstico rápido es esencial en el contexto de un brote, a fin de agilizar la identificación de las fuentes de infección implicadas, para lograr el control temprano del brote y prevenir la ocurrencia de nuevos episodios.

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos rápidos de detección, como pruebas de “screening” o tamizaje, que permiten obtener un resultado presuntivo sobre la presencia de *Salmonella* spp. y otros patógenos en 24-48 horas. Muchos de estos métodos están disponibles comercialmente y algunos de ellos han sido validados por AOAC y/o AFNOR. La base de datos métodos testeados de AOAC contiene más de 20 productos para la detección rápida de *Salmonella*.

Los tests rápidos para detectar el microorganismo y los kits de screening utilizan diferentes tecnologías: nuevas técnicas de cultivo, separación inmunomagnética, ensayos basados en EIA y ELISA, incorporando la detección fluorescente o colorimétrica, ensayos de flujo lateral incorporando la tecnología inmunocromatográfica y técnicas moleculares como hibridización de ADN y ensayos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mayoría de los protocolos, incluyen un paso de enriquecimiento selectivo y luego se usa la técnica de detección rápida que reemplaza al cultivo en medios selectivos y la posterior confirmación por prueba bioquímicas. La mayoría de los métodos pueden dar un resultado en aproximadamente 48 horas o menos, dependiendo del protocolo de enriquecimiento.

Una alternativa de uso creciente en los laboratorios de bromatología es la implementación del método de PCR y PCR en tiempo real, utilizando cebadores o “primers” que permiten amplificar secuencias de ADN específicas, correspondientes a genes marcadores, generalmente asociados con la virulencia propia de género o especie o bien con secuencias correspondientes al ADN ribosomal.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos utilizando estos métodos como tamizaje, se consideran presuntivos y deben ser confirmados por métodos tradicionales, que permitan llegar a obtener microorganismos aislados tipificables. Por otra parte, la recuperación del microorganismo es necesaria para poder realizar estudios complementarios de caracterización y subtipificación, como serotipificación y pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Salmonella* spp. EN ALIMENTOS

Para el control de alimentos, es importante utilizar técnicas avaladas por organismos internacionales como Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Food and Drug Administration (FDA) o Internacional Organization for Standardization (ISO).

Para la detección de *Salmonella* en alimentos, la norma ISO 6579: 2002 fue modificada en 2007 para incluir el análisis de muestras de heces de animales y de muestras ambientales en la producción primaria. Otros organismos internacionales han publicado métodos estándar similares, por ejemplo en el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de United States Food and Drug Administration (FDA).

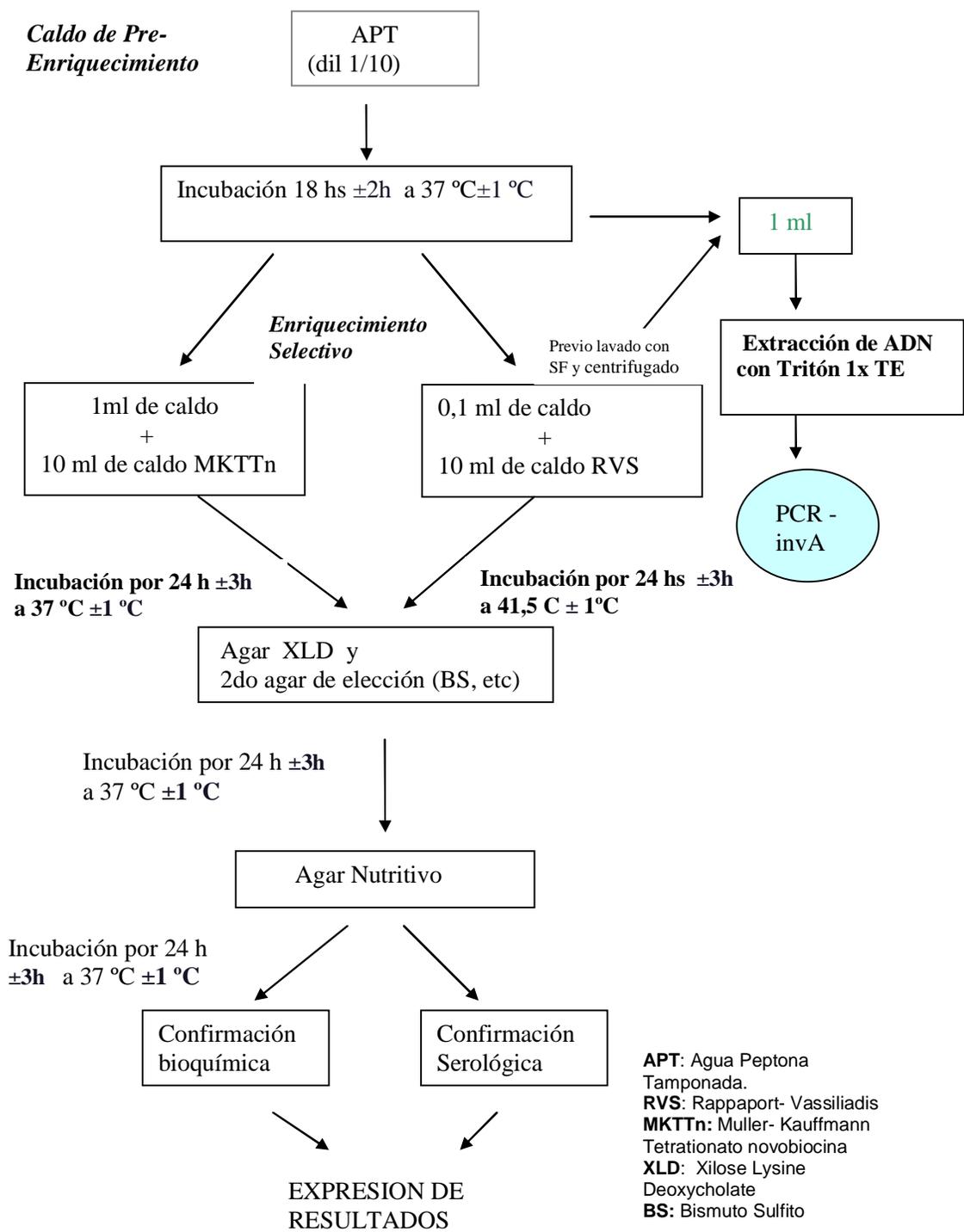
De acuerdo a los lineamientos de la norma ISO 6579:2002 (Fig. 1), el primer paso para la detección de *Salmonella* spp. en la mayoría de los alimentos es un enriquecimiento de la muestra de alimento en un medio líquido no selectivo, agua peptonada buffereada, a 37°C por 18 horas; aunque el medio utilizado en este paso puede variar de acuerdo al tipo de alimento. El cultivo enriquecido en medio no selectivo se subcultiva posteriormente en dos medios de enriquecimiento selectivos diferentes, caldo Rappaport Vasiliadis Soja (RVS) y caldo Muller-Kauffmann Tetrionato-Novobiocina (MKTTn), que son incubados por 24 horas más a 41.5°C (RVS) o 37°C (MKTTn). Seguidamente, el aislamiento en medio sólido se lleva a cabo inoculando una alícuota del cultivo preenriquecido, a partir de los medios RVS y MKTTn en por lo menos dos medios sólidos selectivos, que son incubados posteriormente a 37°C por 24 horas. El método ISO especifica el agar XLD y un medio selectivo opcional. Hay disponible una variedad de alternativas incluyendo agar Bismuto Sulfito, agar verde Brillante y agar Entérico Hektoen. También hay disponibles comercialmente, medios sólidos cromogénicos específicamente diseñados para la diferenciación de colonias de *Salmonella*. Las colonias típicas de *Salmonella* en medios selectivos se subcultivan en medios no selectivos antes de realizar los estudios de identificación por pruebas bioquímicas.

Hay procedimientos bien establecidos para la confirmación e identificación de *Salmonella* spp. La identificación preliminar basada en el aspecto de la colonia en medios cromogénicos y otros medios selectivos se confirma mediante pruebas de bioquímica clásica y serotipificación. Los ensayos bioquímicos clave son la fermentación de glucosa, reacción de ureasa negativa, lisina decarboxilasa positiva, test de indol negativo, producción de H₂S y fermentación de dulcitol. Los ensayos serológicos de confirmación usan sueros polivalentes para antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Aislamientos con un perfil bioquímico típico, que aglutinan con los antisueros O y H se identifican como *Salmonella* spp. Cuando los resultados no son concluyentes es necesario realizar ensayos bioquímicos adicionales.

La identificación bioquímica de *Salmonella* spp. se puede realizar también utilizando sistemas de confirmación comerciales.

Si se desea completar la determinación de la serovariedad de *Salmonella* spp., los aislamientos se deben remitir a laboratorios de referencia ya que es una tarea que usualmente no realizan de rutina laboratorios de clínica o de alimentos. Los laboratorios de referencia también están capacitados para realizar estudios más complejos como fagotipificación, perfil de sensibilidad a los antibióticos y electroforesis en campo pulsado (PFGE) para la caracterización y subtipificación molecular de aislamientos.

Fig. 1 Flujograma para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. a partir de alimentos. Método ISO/FDIS 6579:2002. Se indican además las etapas para el tamizaje por PCR (gen *invA*)



TAMIZAJE POR PCR PARA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN ALIMENTOS

En contraste con las determinaciones fenotípicas, las técnicas de identificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de secuencias de ADN son específicas, sensibles y reproducibles y permiten un rápido diagnóstico, que puede utilizarse como tamizaje en la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos

Existen varios trabajos reportando la amplificación de genes específicos para la identificación rápida de *Salmonella*. Malorny y col. describieron una reacción de PCR basada en la amplificación del gen *invA* que permite la detección de *Salmonella enterica* y *S. bongori* y ha sido validada en un ensayo interlaboratorios (Malorny et al. 2003, Rahn et al. 1992). El gen *invA* forma parte de la isla de patogenicidad 1 (IPS-1) de *Salmonella* y codifica una proteína (InvA) que forma parte del sistema de secreción tipo III involucrado en la interacción inicial e invasión de células epiteliales intestinales. Los genes de la estructura IPS-1 comprenden un segmento de 40 Kb presente en el cromosoma de todas las subespecies de *Salmonella*.

La reacción de PCR descrita por Malorny y col. incluye la incorporación de un control interno a la mezcla de reacción, el cual permite confirmar que la PCR se desarrolla en condiciones adecuadas y todos los reactivos funcionen. Este control contiene secuencias del gen *invA* y es coamplificado con el fragmento blanco, dando como producto un segmento de ADN de distinto tamaño. El uso de este control interno es de gran utilidad para descartar la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa, que suelen estar presentes en muestras de alimentos y en muestras clínicas. En ausencia de inhibidores, la banda del control interno puede no ser amplificada en muestras con altos inóculos de *Salmonella*, debido a inhibición competitiva, sin embargo en estos casos el resultado positivo de la reacción no requiere la amplificación simultánea del control.

Se describe a continuación el protocolo de procedimientos para la detección del gen *invA*, en base a la técnica de Malorny et al. 2003, con ligeras modificaciones realizadas durante la implementación y validación del procedimiento en un trabajo colaborativo entre el Centro de Referencia Regional de GFN América del Sur y el Laboratorio de Microbiología de la Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Esta técnica puede aplicarse utilizando ADN templado extraído por hervido a partir del medio de pre-enriquecimiento APT o a partir del caldo RVS, como se indica en la Fig. 1 de esta sección. Cabe señalar que la amplificación a partir de APT permite obtener resultados en menor tiempo, aunque la sensibilidad de la técnica es superior al realizar la PCR a partir de RVS, luego del enriquecimiento selectivo.

Protocolos de procedimientos para la detección de *Salmonella* spp. por PCR

Paso 1 - Extracción de ADN

1.1 – Extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano

Para los cultivos bacterianos de *Salmonella* spp. que deben utilizarse como controles positivos de la reacción, seguir el siguiente procedimiento para la extracción de ADN:

A partir de un cultivo puro en placa de agar tripticasa soja (TSA), resuspender dos ó tres colonias en 500 µl de agua tridestilada. Calentar esta suspensión a 100°C durante 10 min y centrifugar 1 min. a 12.000 rpm. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y estéril.

Los templados así preparados pueden conservarse a -20°C.

1.2 – Extracción de ADN a partir de muestras de alimentos

A partir del caldo de pre-enriquecimiento, APT, post-18hs a 37°C, tomar 1ml y centrifugar 15 min a 12000 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender en 150 ul de Triton al 1% en TE1X.

A partir del caldo RVS post-18hs a 37°C, tomar 1ml y centrifugar 15 min a 12000 rpm. Descartar el sobrenadante, resuspender en 1 ml de solución fisiológica, a fin de eliminar componentes del medio de cultivo que pueden interferir en la PCR, y centrifugar 15 min a 12000 rpm. Resuspender en 150 ul de Triton al 1% en TE1x.

Para lisar las células bacterianas, colocar los tubos con las suspensiones en buffer Tritón 1%-TE1X a 100°C durante 10 min. Enfriar y centrifugar 1 min a 12000 rpm y luego pasar 200 ul del sobrenadante a un tubo limpio. Este sobrenadante se puede utilizar como templado de la PCR inmediatamente o puede conservarse a -20°C para su uso posterior.

Paso 2 – Amplificación del gen *invA* por PCR

Los primers o cebadores utilizados para la detección del gen *invA*, son:

Primer 139: GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA

Primer 141: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC

(Malorny et al 2003, Rahn et al 1992)

Para la amplificación, se prepara la mezcla de reactivos descritos en Tabla 1. Todos los reactivos deben permanecer en frío y mezclarse bien antes de dispensarlos. El procedimiento debe hacerse en un área limpia de amplicones o cabina de flujo laminar. Se realiza la mezcla, añadiendo primero los reactivos de mayor volumen y por último la enzima ADN *Taq* polimerasa. Una vez homogenizada la mezcla, se fracciona en tubos de PCR de 0.2 ml, 23 ul en cada tubo. En otra área, se añaden 2 µl de ADN de cada una de las muestras en cada tubo y luego se introducen en el termociclador. Este debe tener

programado los ciclos con sus respectivas temperaturas (Tabla 2). Es importante mantener los tubos en hielo hasta el momento de introducirlos en el ciclador.

Tabla 1. Mezcla de reacción para PCR *invA*

Reactivos	Volumen para 1 muestra (µl)	Concentración
H ₂ O	11.0	
Buffer 10X	2,5	1X
Cl ₂ Mg (50mM)	0,75	1.5 mM
dNTPs (2.5mM)	2	0.2mM
BSA 10 mg/ml	0.5	200 ng/ul
Primer <i>invA</i> 139 (10 mM)	1	0.4 uM
Primer <i>invA</i> 141 (10 mM)	1	0.4 uM
Taq (5UI/ul)	0,25	1.25 U/ensayo
DNA templado	5	
IAC (300 copias)	1	
Vol Final	25	

Tabla 2. Condiciones de ciclado PCR gen *invA*

	95°C	1 min	
Paso 2	95°C	30 seg	} 38 ciclos
Paso 3	64°C	30 seg	
Paso 4	72°C	30 seg	
Paso 5	72°C	4 min	
Gel de agarosa 2%			
Tamaño de fragmento	284 pb (<i>invA</i>)		
	157 bp (CIA)		

Paso 3 - Detección de los productos de PCR

- Gel de Agarosa

Para preparar el gel, se pesa la agarosa según el tamaño del gel que se desea preparar, se agrega el volumen de buffer TAE 1X correspondiente para lograr una concentración de agarosa 2% y se funde en el horno microondas a 40% de potencia. La agarosa fundida se coloca en el soporte armado con su peine, que es retirado una vez solidificado el gel.

- Electroforesis

Una vez solidificado el gel, se coloca en la cuba electroforética que contiene suficiente cantidad de buffer TAE 1X de tal modo que el gel quede cubierto. Se mezcla el buffer de siembra con la muestra en una proporción de 1 parte y 5 partes respectivamente, y se cargan 10-20µl de cada dilución por pocillo. Se siembra también el marcador de peso molecular. A la par de las muestras, se siembran el control positivo y el control negativo. Se conecta la cuba a la fuente de poder teniendo la precaución de que la línea de siembra se encuentre en el polo negativo ya que las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo. Las condiciones de la corrida electroforética recomendadas son 100 voltios durante 30 minutos.

- Tinción del gel

Finalizada la corrida electroforética se procede a la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio en una concentración de 1µg/ml durante 30 minutos. Luego se enjuaga el gel en agua destilada.

Precaución: el bromuro de etidio es un reactivo cancerígeno por lo cual debe manipularse con extremo cuidado y el operador debe estar protegido con guantes.

- Observación de los fragmentos

El gel teñido es colocado en el transiluminador de UV que permite la visualización de las bandas de las diferentes muestras. Comparando la distancia recorrida de los fragmentos obtenidos de las muestras con el marcador de peso molecular se puede estimar el tamaño de los fragmentos. Para documentar esta reacción puede obtenerse una fotografía.

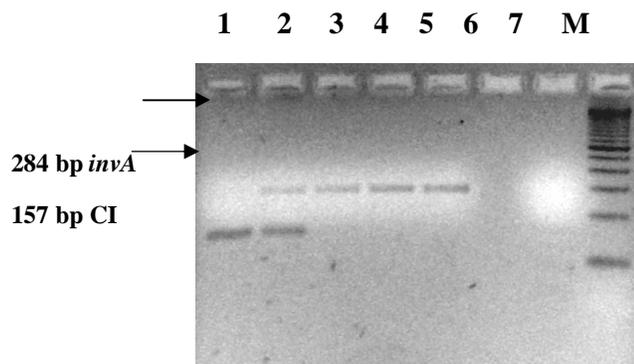


Fig. 2 PCR gen *invA* (realizada a partir de aislamientos bacterianos). Carriles: 1, *Shigella sonnei*; 2-5, *Salmonella* Enteritidis; 7, mezcla de reacción sin templados de ADN; 8, marcador de peso molecular 100 bp ladder. Nótese que en las calles 3 a 5 no se observa amplificación del control interno debido a un efecto de competencia con el templado de *Salmonella* (templados muy concentrados), sin embargo en la calle 1 correspondiente a *Shigella sonnei* sólo se observa la banda del control interno confirmando que esta muestra es negativa para *Salmonella*; en la calle 2, correspondiente a una muestra con bajo inóculo de *Salmonella* se observan las bandas correspondientes al gen *invA* y al control interno.

BIBLIOGRAFÍA

Malorny B., Hoorfar J., Bunge C., Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl. Environmen. Microbiol. 2003; 69: 290-296.

Persing D., Smith T., Tenover F. and White T. En Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Ed., 1993. Part I; 51-104.

Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C., McEwen S.A., Galán J.E., Ginocchio C., Curtis III R., Gyles C.L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes 1992; 6: 271-279.

ANEXO I – *Salmonella* spp.

Soluciones

- **Solución stock de EDTA 0.5M, pH 8.0**

Pesar 186.1g de sal sódica de EDTA y disolverlo en 800 ml de agua tridestilada con ayuda de un agitador magnético. El pH debe ser ajustado con NaOH 10N, y finalmente el volumen completado a 1 L.

- **Buffer Tris-Acetato (TAE) 50X**

Para 250 ml pesar 60.5 g Tris base y disolver por agitación en 150 ml de agua tridestilada. Adicionar 14.2 ml de ácido acético glacial y 25 ml de una solución 0.5M EDTA pH 8.0. Agregar agua tridestilada hasta completar 250 ml. Homogenizar y autoclavar. Se conserva a temperatura ambiente

- **Buffer de Siembra 6X**

Xileno cianol ó Azul de bromofenol 0.25% (P/V)

Glicerol 30% (V/V)

Agua destilada estéril. Conservar a 4°C

- **Solución de bromuro de etidio**

A partir de una solución stock de 10 mg/ml se realiza una dilución 1/10,000 para obtener una concentración final de 1µg/ml.

Para 1 litro se agregan 100µl de la solución stock. Esta solución se conserva a temperatura ambiente a resguardo de la luz.

- **Decontaminación de la solución de bromuro de etidio**

Para decontaminar la solución se agregan 200 mg de carbón activado cada 100 ml de solución de bromuro de etidio. Dejar 24 hs a temperatura ambiente con agitación intermitente. Filtrar con papel de filtro Whatman N° 1 y descartar el filtrado y eliminar el filtro y el carbón remanente en envases para residuos patológicos.

ANEXO II – *Salmonella* spp.

INSUMOS NECESARIOS PARA EXTRACCIONES DE ADN Y PCR

Material y equipamiento para extracción de ADN

- **Reactivos**
 - Agar tripticasa soja
 - Agua Calidad Biología Molecular estéril
 - Buffer TE 1X Tritón 1%

- **Insumos descartables**
 - Placas de Petri
 - Tips estériles (200 y 1000 µl)
 - Microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml
 - Hisopos, escarbadientes o ansas plásticas estériles.
 - Guantes de látex

- **Equipos**
 - Micropipetas de 1000µl
 - Estufa de 37°C
 - Bloque Térmico o baño a 100°C
 - Microcentrífuga
 - Pipetas para 100ul y 1000ul (común de la mesada)
 - Mechero

Reactivos para PCR

- Reactivos
 - Agua Calidad Biología Molecular estéril
 - Buffer de la enzima, incluido en el equipo comercial de la enzima
 - Cloruro de magnesio, incluido en el equipo comercial de la enzima
 - Primers o cebadores: Se reconstituyen con agua tridestilada o buffer TE (Tris-EDTA) según la recomendación del fabricante para obtener una concentración de 100 µM. Se realiza una dilución 1/10 para obtener la solución de trabajo (10 µM).
 - Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Se prepara una mezcla de los cuatro dNTPs juntos en concentración final de 2.5mM para cada uno.
 - Enzima polimerasa termoestable (Taq DNA polimerasa) de origen comercial

- Insumos descartables
 - Microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml.
 - Tubos para reacción de PCR de 0.2 ml nuevos, libres de DNAsas.
 - Tips de barrera ART (aerosol resistant tips)
 - Bloque térmico refrigerado o hielo
 - Guantes de látex

- Equipos
 - Termociclador
 - Cabina de bioseguridad (área limpia)
 - Micropipetas (10 µl, 100µl, 200µl y 1000µl)
 - Pipeta para cargar ADN 10 ul

ANEXO II – *Salmonella* spp. (cont.)

Detección de los productos de PCR

- Reactivos
 - Agarosa
 - Buffer TAE 1 X
 - Buffer de siembra 6X (xilene-cyanol o azul de bromofenol)
 - Marcador de peso molecular de 100pb.
 - Bromuro de etidio
 - Agua destilada

- Insumos descartables
 - Probetas de 50 y 1000 ml
 - Erlenmeyers
 - Tips

- Equipos
 - Micropipetas de 20µl
 - Balanza
 - Horno microondas o equivalente
 - Cubas electroforéticas y accesorios
 - Fuente de poder
 - Transiluminador UV
 - Cámara fotográfica

IV) PROCEDIMIENTOS PARA LA INVERSION DE FASE FLAGELAR EN SALMONELLA SPP.

INTRODUCCIÓN

La base de la serotipificación para *Salmonella* spp, es determinar la presencia de antígenos somáticos de superficie (antígenos O, lipopolisacárido), antígenos flagelares (antígenos H, proteínas) y antígeno capsular (Vi - polisacáridos). Este último antígeno solamente se encuentra presente en muy pocas serovariedades.

Combinando el resultado obtenido de las determinaciones de los antígenos somáticos y flagelares, con el agregado del antígeno capsular, se obtiene el nombre de la serovariedad, de acuerdo con el "Esquema de Kauffmann-White".

Salmonella spp. es una bacteria móvil a través de flagelos peritricos, formados por aproximadamente 2000 unidades de flagelina repetidas que se polimerizan para formar los filamentos flagelares.

Las células pueden presentar una o dos fases flagelares:

- Cepas monofásicas: unas pocas serovariedades presentan una sola fase flagelar, por ejemplo:
 - *Salmonella* Enteritidis (1, 9, 12: g, m:-),
 - *Salmonella* Typhi (9,12 [Vi]:d:-).

- Cepas difásicas: que constituyen la gran mayoría de las serovariedades tienen dos especificidades en su antígeno flagelar, por ejemplo:
 - *Salmonella* Typhimurium (1, 4, 5,12: i: 1,2) tiene una fase 1 que es el antígeno i y la fase 2 que es el antígeno 1,2.

Las cepas difásicas, exhiben una u otra especificidad antigénica flagelar, expresando alternativamente dos genes: *fliC* para la fase 1 y *fljB* para la fase 2. Estos genes se encuentran localizados en diferentes partes del cromosoma y codifican las flagelinas de distinta antigenicidad.

Cada célula en la población bacteriana expresa sólo uno de estos dos genes flagelares y alterna la expresión de uno o de otro en una relación de 10^{-3} a 10^{-5} por ciclo de generación. Este fenómeno es conocido como variación de fase flagelar y está controlado por la inversión reversible de un segmento de ADN, que contiene un promotor para el gen *fljB*.

El promotor para el operón *fljBA* está localizado dentro de un segmento de ADN reversible. En un sentido, el operón *fljBA* se expresa y se produce la flagelina FljB junto con FljA, que actúa como represor del gen *fliC*, que codifica la flagelina FliC (de fase 1). En el sentido opuesto, el gen *fljB* no se expresa, ni tampoco el represor FljA, por lo tanto se transcribe el gen *fliC*, apareciendo la proteína FliC (de fase 2) (ver Figura 1).

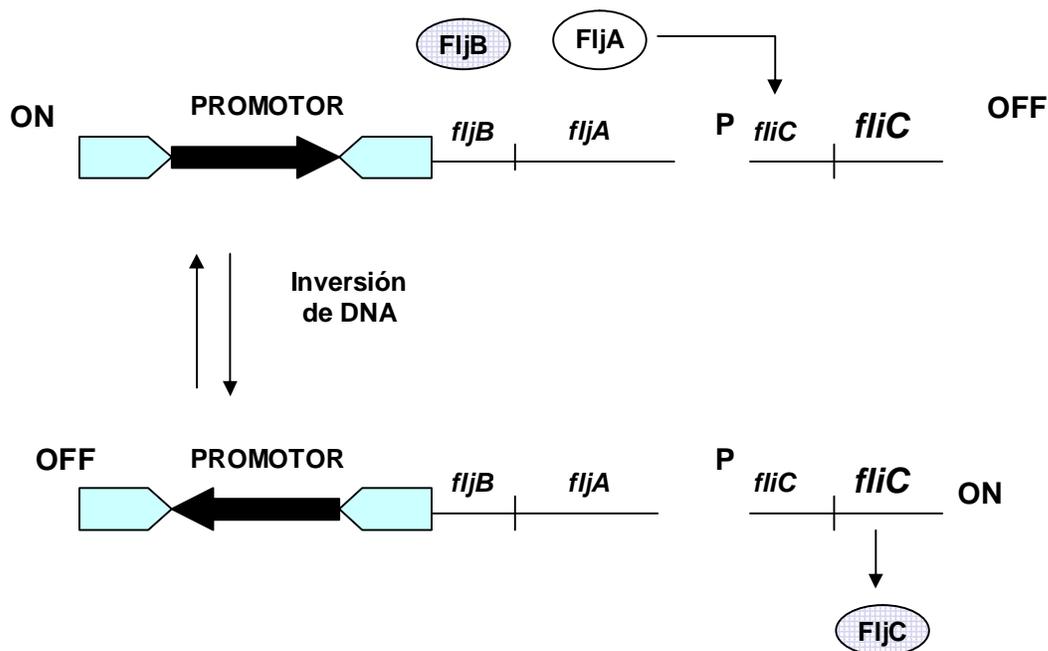


Figura 1: Representación esquemática de la variación de fase flagelar en *S. enterica*.

Tomando como ejemplo *S. Typhimurium*, (1, 4, 5, 12: i: 1,2), puede sintetizar flagelos de especificidad H: i o de H: 1,2; un cultivo de *S. Typhimurium*, es una mezcla de células bacterianas, con flagelos de especificidad H: i y de especificidad H: 1, 2.

Si la población está balanceada, un cultivo puede aglutinar con los antisueros contra las fases H: i y H:1,2.

Si la gran mayoría de la población tiene flagelos con especificidad H: i, el cultivo no va a aglutinar con el antisuero H:1,2.

Para la identificación de las serovariedades difásicas, es esencial la determinación de las dos fases flagelares, por lo tanto es necesario seleccionar, la minoría de la población bacteriana que posee flagelos de la fase H: 1,2, en el caso de este ejemplo.

Esto se realiza mediante el Método de Inversión de Fase, que consiste en la inmovilización de la fase ya expresada, para permitir la expresión de la otra fase. Para esto se usa la propiedad que tienen los anticuerpos de inmovilizar a los antígenos flagelares H homólogos.

En agar semisólido adicionado del antisuero H: i, las células bacterianas que poseen flagelos de esta especificidad serán inmovilizadas y se expresarán las que poseen los flagelos de la otra fase. Estas células se movilizarán a través del medio de cultivo y se producirá una aglutinación con el antisuero H: 1,2.

La inversión de fase se puede realizar de dos maneras:

a) Placa movilidad: en placa de Petri de 60 mm de diámetro con agar movilidad. El microorganismo se siembra en un extremo de la placa y luego de la incubación se recoge material del extremo opuesto al punto de siembra (Fig. 2)

b) Tubo de Craigie: un tubo de vidrio abierto en ambos extremos se coloca dentro de un tubo de ensayo (13 mm x 160 mm) y se agrega agar movilidad. El microorganismo se siembre dentro del tubo interior y luego de la incubación se observa donde hay desarrollo bacteriano. Las bacterias no móviles permanecerán dentro del tubo interior en el sitio de inoculación, mientras que las bacterias móviles pueden moverse fuera del tubo y crecer en el medio circundante (Fig. 3)

PROCEDIMIENTOS

PLACA DE AGAR MOVILIDAD (SWARM AGAR)

TEORÍA / COMENTARIOS

- 1) Fundir el agar movilidad (Swarm agar) y dejar enfriar a 40-45° C.
- 2) Mezclar en una caja de Petri de 60mm, 2 gotas (50µl) de antisuero para inversión de fase, correspondiente a la fase flagelar previamente determinada, con 10 ml de agar movilidad.
- 3) Homogenizar por rotación y dejar solidificar.
- 4) Sembrar una ansada de un cultivo en caldo tripticasa de soja (TSB), de 18-24h en uno de los bordes de la placa (ver Figura 2).
- 5) Incubar a 35-37° C, durante 18-24

Si la segunda fase no puede ser detectada luego de 18-24hs de desarrollo, dejar incubando 48 horas más hasta observar crecimiento en el extremo opuesto al punto de siembra y repetir el procedimiento de detección.

horas, hasta que se observe crecimiento en el extremo opuesto del punto de siembra.

Ver Consideraciones a tener en cuenta.

6) Transferir una ansada del crecimiento del Punto I a caldo tripticasa de soja (TSB) para hacer serotipificación flagelar en tubo o resuspender una ansada del mismo Punto I en 20µl de solución fisiológica para realizar serotipificación flagelar en placa.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Registrar el grado de aglutinación de la siguiente manera:

4+: 75 a 100% de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido claro

3+: 75% aproximadamente de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido ligeramente turbio

2+: 50% aproximadamente de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido moderadamente turbio

1+: menos de 25% de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es turbio

Negativo: ausencia de aglutinación, caracterizada por una suspensión homogénea.

Registrar resultados negativos o positivos para los antígenos H estudiados, en Registro de Resultados-Serotipificación Flagelar de *Salmonella* spp.

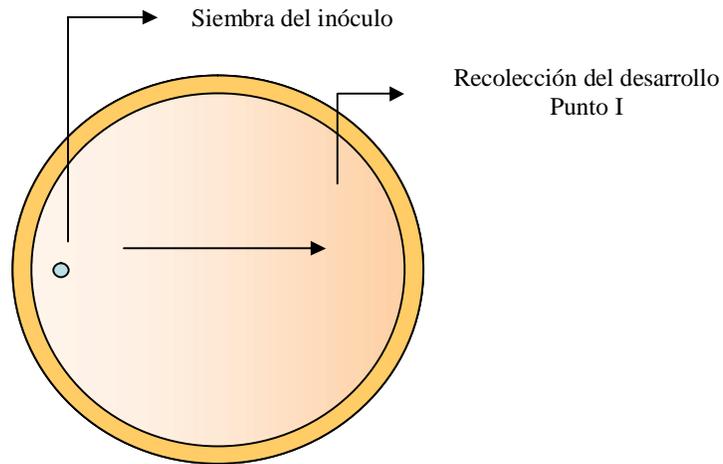


Fig. 2 Esquema de la siembra en placa movilidad

TUBO DE CRAIGIE

TEORÍA / COMENTARIOS

- 1) Fundir el agar movilidad (Craigie) y dejar enfriar a 40-45° C.
- 2) Adicionar 2 gotas (50µl) de antisuero para inversión de fase, correspondiente a la fase flagelar previamente determinada.
- 3) Homogenizar con movimientos de rotación y dejar solidificar.
- 4) Sembrar con un ansa ojal un cultivo en caldo tripticasa de soja (TSB) de 18-24 horas, dentro del tubo interior del tubo de Craigie, hasta aproximadamente 0,5 cm de profundidad (ver Figura 3).
- 5) Incubar a 35-37° C, durante 18-24 hs hasta que se observe crecimiento en la superficie de la parte externa del medio.
- 6) Transferir el crecimiento de la parte externa del medio a TSB para hacer serotipificación flagelar H en tubo, o a una estría de agar TSA para hacer la serotipificación flagelar H en lámina.

Si la migración hacia la superficie de la parte externa del tubo no se produjo en el lapso de 18-24 hs dejar incubando el tubo el tiempo necesario, hasta lograr crecimiento en la superficie del medio externo y realizar el procedimiento de detección.

Ver Consideraciones a tener en cuenta.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Registrar el grado de aglutinación de la siguiente manera:

4+: 75 a 100% de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido claro

3+: 75% aproximadamente de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido ligeramente turbio

2+: 50% aproximadamente de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido moderadamente turbio

1+: menos de 25% de microorganismos aglutinados y el sobrenadante es turbio

Registrar los resultados negativos opositivos para los antígenos H estudiados, en Registro de Resultados - Serotipificación Flagelar de *Salmonella* spp.

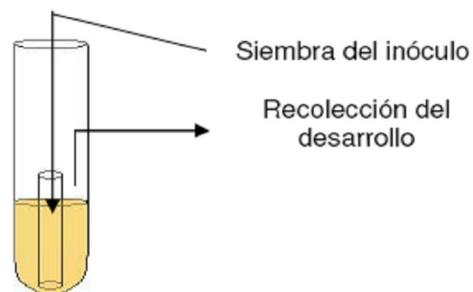


Figura 3. Tubo de Craigie

CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA

- Si no se observa movilidad del cultivo después de 15 días de incubación en tubo de Craigie o de 72 hs. en la placa de agar movilidad y solamente hay desarrollo en el punto de siembra, el aislamiento es monofásico o es NT (no tipable) de acuerdo a las indicaciones del esquema de Kauffmann-White. En este caso se deben probar diferentes colonias del aislamiento original, para intentar tipificar nuevamente la fase.
- Si se observa movilidad, tanto en placa de agar movilidad como en tubo de Craigie, pero no se logra detectar la segunda fase, puede ser, que se requiera incrementar la concentración de antisuero para inversión de fase. Por otro lado si no reacciona con ninguno de los antisueros flagelares polivalentes, hay que tener en cuenta que la cepa puede presentar un antígeno flagelar no incluido en dichos antisueros, en este caso debe ser remitida al Laboratorio Nacional de Referencia para completar su serotipificación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Caffer, M.I, Terragno, R., Binsztein, N. 2008. Manual de procedimientos “Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp”. WHO Global Salm-Surv – OMS/OPS – Ministerio de Salud de la Nación. I.N.E.I. A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”.
2. Bonifield, H.R. and Hughes, K.T. 2003. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by posttranscriptional control mechanism. J. Bacteriol. 185:3567-3574.
3. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th. Edition. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
4. Grimont, P.A.D., & Weill F-X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9^a Ed, WHO Centre for Reference and Research on Salmonella, Instituto Pasteur, París, Francia.
5. Silverman, W., Zeig, J., Hilmen, M. and Simon, M. 1979. Phase variation in *Salmonella*: Genetic analysis of recombinational switch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:391-395.

**PLANILLA 1- REGISTRO DE RESULTADOS: SEROTIPIFICACION FLAGELAR DE
CEPAS DE *SALMONELLA* spp.**

Fecha: _____

Nombre: _____

Muestra: _____

HSA	HSB	HSC	HS1		Control

HSA	a	b	c	d	i	z10	Z29

HSB	e,h	e,n,x	e,n,z15	f.g	g,m	g,p	m,t

HSC	k	l,v	l,w	r	y	Z	z4,z23

HS1	1,2	1,5	1,6	1,7	z6

HSA	HSB	HSC	HSD	HS1		Control

HSA	a	b	c	d	i	z10	z29

HSB	e,h	e,n,x	e,n,z15	f.g	g,m	g,p	m,t

HSC	k	l,v	l,w	r	y	Z	z4,z23

HS1	1,2	1,5	1,6	1,7	z6

ANEXO I – *Salmonella* inversión de fase

MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

- Estufa de cultivo a 37° C
- Heladera a 4° C
- Baño de agua a 50° C
- Ansas
- Tubos de ensayo
- Tubos de 13x100 mm con tapa a rosca
- Tubos de Craigie
- Cajas de Petri de 60 mm
- Láminas de vidrio de 20x20 cm
- Portaobjetos
- Pipetas de 5 ml
- Gradillas
- Mecheros
- Lámparas para leer aglutinaciones
- Palillos de madera

MEDIOS

- Estrías de agar tripticasa de soja (TSA)
- Caldo tripticasa de soja (TSB)
- Agar movilidad (Swarm Agar)
- Agar movilidad (Craigie)

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Antisueros flagelares H
- Antisueros para inversión de fase H
- Solución fisiológica formolada al 1%
- Solución fisiológica

CEPAS BACTERIANAS

Cepas de *Salmonella spp.* en agar TSA o caldo TSB, cultivos de 18-24 horas a 37°C

Esquema de Kauffmann-White (Grimont, P.A.D., & Weill F-X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9ª Ed, WHO Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Instituto Pasteur, París, Francia).

ANEXO II – *Salmonella* inversion de fase

MEDIOS

AGAR MOVILIDAD (SWARM AGAR)

Los componentes del medio son: extracto de levadura 1,0g, extracto de carne 5,0g, caldo tripticasa de soja 30g, agar-agar de 5 a 10g dependiendo de la dureza deseada. Los componentes se disuelven en 1000 ml de agua destilada calentando si es necesario. Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza a 121° C por 15 minutos.

AGAR MOVILIDAD (CRAIGIE)

Los componentes del medio son: peptona, 10,0 gr; extracto de carne, 3,0gr; cloruro de sodio, 5,0 gr ; agar, 5,0 gr; agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4.

Preparación de tubos: En tubos de 10 x 160 mm con tapa a rosca, con una varilla hueca de 8 cm aproximadamente, se colocan 5 ml de agar al 0,5%. Se esteriliza a 121° C por 15 minutos.

SOLUCIÓN FISIOLÓGICA

Se disuelve 8.5 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.0 y autoclavar a 121°C por 20 minutos.

SOLUCIÓN FISIOLÓGICA FORMULADA

Los componentes del medio son: cloruro de sodio 8,5 gr; formalina (37-40%), 10,0 ml; agua destilada c.s.p. 1000 ml.

V) BIOSEGURIDAD

Los microorganismos con los que se trabajará durante el curso son patógenos humanos, pueden causar infecciones o enfermedad, pero existen medidas terapéuticas eficaces y su propagación es limitada. Siempre se deben utilizar prácticas de bioseguridad de nivel 2, disponer de barreras de contención secundarias: equipo de protección personal (guardapolvos, guantes); piletas para lavado de manos; gabinetes de bioseguridad; e instalaciones de descontaminación de desechos. Extremar las medidas de precaución al manipular y transferir gran número de células.

INSTRUCCIONES PARA EL TRABAJO

- 1) Leer cuidadosamente todas las instrucciones antes de comenzar con el protocolo de trabajo.
- 2) Considerar **POTENCIALMENTE CONTAMINADO** a todo el material de plástico, vidrio, pipetas, espátulas, etc. que esté en contacto con las suspensiones bacterianas o los “plugs”.
- 3) Todo material contaminado potencialmente infeccioso se tratará en autoclave. No efectuar ninguna limpieza del mismo en el laboratorio.
- 4) Descartar los residuos plásticos potencialmente infecciosos (por ejemplo, tips, ansas, microcubetas y microtubos) en recipientes resistentes a la perforación con solución de hipoclorito de sodio al 10%, con un volumen adecuado para sumergir el material descartado. **NO SE DEBEN LLENAR TOTALMENTE.**
- 5) Descartar los materiales con cultivos microbianos en recipientes con bolsas de plástico de color rojo, para su posterior incineración.
- 6) Descartar el material de vidrio en recipientes de acero inoxidable con tapa de seguridad para su posterior descontaminación en autoclave.
- 7) Utilizar guardapolvos con mangas largas y puño ajustado. **NO SE PUEDEN RETIRAR DEL AREA DE TRABAJO.**
- 8) Dada la condición de agente tóxico y mutagénico del bromuro de etidio, utilizar guantes y extremar las precauciones para su manipulación, utilizar recipientes de cierre hermético para las tinciones y lavados. **TODA SOLUCIÓN CONTENIENDO BROMURO DE ETIDIO SE DEBE INACTIVAR CON CARBÓN ACTIVADO DURANTE UN MINIMO DE 6 HORAS.**
- 9) Cada mesada deberá contar con propipetas, guantes, alcohol 70% y una solución de hipoclorito de sodio 10% para la decontaminación de materiales o superficies de trabajo.
- 10) Está prohibido beber, comer, fumar o maquillarse en el laboratorio.
- 11) Lavarse las manos cuidadosamente después de cualquier manipulación en el laboratorio y antes de retirarse del mismo.

12) Notificar a las personas responsables del área o instructores de trabajos prácticos cuando se produzcan derrames de productos químicos o biológicos, quienes tomarán las medidas adecuadas según del caso.

13) Descartar el material de vidrio roto de la siguiente forma:

Envolver los vidrios con papel, colocarlo en bolsa plástica y finalmente en un recipiente resistente y rotulado con claridad "vidrios rotos". En caso de ser material contaminado se debe informar inmediatamente a los instructores de trabajos prácticos.

CENTROS PARA REQUERIR AYUDA (Buenos Aires, Argentina)

- 1) EMERGENCIAS: S.A.M.E., teléfono: 107
- 2) QUEMADURAS: Hospital de Quemados, teléfono 4923-4082/3022
- 3) OFTALMOLOGIA: Hospital Santa Lucía, teléfono 4941-7077
- 4) INTOXICACIONES: Hospital Dr. P. Elizalde, Toxicología, teléfono 4300-2115
- 5) BOMBEROS: Servicio de Emergencias, teléfono 100, Cuartel Barracas: teléfono 4301-4549

El laboratorio cuenta con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia. Ante cualquier duda, consulte a los instructores de trabajos prácticos.

REFERENCIAS

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ra edición, Organización Panamericana de la Salud-OMS.

www.who.int/entity/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). CDC, USA, 2009

www.cdc.gov