

5081UY

Detección de *Salmonella spp.* en muestras de residuos sólidos, destinadas a ser usadas como mejoradores de suelo

Técnica cualitativa - qPCR



Elaborado - A. Sanabria

Modificado - I. Pandulli

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental



1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la detección de *Salmonella spp.* en muestras de residuos sólidos destinadas a ser usadas como mejoradores de suelos, mediante la combinación de técnicas tradicionales y moleculares, que permiten obtener resultados en 72 h. El límite de detección (eLOD₅₀) es de ≤ 4 UFC/25 g de residuo sólido.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.5. Procedimiento: "Extracción de ADN con kit comercial"(5082UY).
- 2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16).
- 2.7. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07).
- 2.8. Procedimiento manejo de cepas (PGC 24).
- 2.9. Instructivos de uso autoclave vertical (INE 13).
- 2.10. Instructivo de uso balanza (INE 16).
- 2.11. Instructivo de uso desionizador (INE 82).
- 2.12. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).
- 2.13. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44).
- 2.14. Instructivo de uso incubadora 35 °C (INE 46).
- 2.15. Instructivo de uso de centrifuga (INE 124).
- 2.16. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 145).
- 2.17. Instructivo de uso de termociclador a tiempo real (INE 149).
- 2.18. Instructivo para la digitalización y respaldo de datos de equipos analíticos (INC 23).
- 2.19. Instructivo de uso de cuba electroforesis (INE 150).
- 2.20. Rutas de análisis de detección de *Salmonella* (RMB 17).
- 2.21. Ruta para preparación de reactivos de biología molecular (RPR 25).
- 2.22. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El género *Salmonella* está compuesto de 7 grupos filogenéticos, que habitualmente se clasifican en dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. La mayoría de las cepas de *S. entérica* son patógenos entéricos. Los residuos sólidos de la categoría II pueden ser usados como mejoradores de suelo, pero deben demostrar la ausencia de éste patógeno.
- 3.2. Este método combina las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento de la microbiología clásica, con una etapa de detección-confirmación que se realiza por técnicas moleculares: se extrae ADN a partir del caldo de enriquecimiento y se detecta al patógeno por qPCR, con primers específicos. Estos están dirigidos al locus *ttr*, cuyos genes codifican para proteínas que permiten que la bacteria emplee el tetracionato como aceptor final de electrones (respiración del tetracionato).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. La manipulación de la muestra y el análisis deben ser realizados utilizando túnica, anteojos de protección y guantes descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.
- 4.2. Usar la túnica específica del área de trabajo para las reacciones de amplificación de ADN y guantes sin talco.
- 4.3. Las técnicas moleculares son muy sensibles a la contaminación: para evitar contaminaciones cruzadas se debe trabajar con un flujo de no retorno.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La presencia de tóxicos orgánicos, como fenoles, en la matriz residuos sólidos, junto con una baja densidad de *Salmonella* spp., pueden afectar la recuperación del microorganismo.
- 5.2. Las reacciones de amplificación del ADN pueden verse inhibidas por talco, polvo, restos de material vegetal (carbohidratos complejos, almidón), restos de reactivos de la extracción de ADN (fenol, CTAB, guanidina de las columnas de purificación, etc.). Es recomendable asegurar la pureza y calidad del ADN a emplear, así como la higiene de las superficies y las pipetas a emplear.
- 5.3. Si la cantidad de ADN de la muestra es excesiva, se puede ver inhibida la reacción de amplificación. Se puede cuantificar el ADN y realizar diluciones pertinentes si es necesario (trabajar con un máximo de 50-20 ng de ADN por reacción).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Se deben coleccionar al menos 100 g de residuo sólido en bolsa tipo WhirlPak estéril.
- 6.2. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. Si esto no es posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). El período máximo de conservación de la muestra es de 24 h.
- 6.3. El ADN extraído se puede mantener a $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego del análisis de la muestra, durante 28 días. Posteriormente, puede ser reservado por Laboratorio Ambiental, ya que puede servir de insumo para constituir una colección nacional, útil para estudios prospectivos de interés.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.2. Autoclave
- 7.3. Mecheros
- 7.4. Bolsa estéril, por ejemplo tipo Whirl-Pak
- 7.5. Material de vidrio para preparación del medio de cultivo.
- 7.6. Incubadora a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 7.7. Heladera a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 7.8. Freezer $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 7.9. Ansa
- 7.10. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 90 mm de diámetro
- 7.11. Cinta de revelado de autoclave
- 7.12. Desionizador de agua
- 7.13. Equipo para obtención de agua ultrapura
- 7.14. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)
- 7.15. Cabina de preparación de la PCR
- 7.16. Minifuga
- 7.17. Vortex
- 7.18. Juego de micropipetas de 200- 1000 μL y de 10 mL para uso microbiológico
- 7.19. Juego de micropipetas de 200- 1000 μL , 20-200 μL , 2 – 20 μL para uso exclusivo de reactivos NO ADN
- 7.20. Pipeta 0,2-2 μL para uso exclusivo de ADN
- 7.21. Tips estériles
- 7.22. Tubos eppendorff de 1,5 mL estériles
- 7.23. Tubos de vidrio con capacidad para 50 mL (tipo doble concentración, 2 cm de diámetro)
- 7.24. Tubos de PCR ópticamente adecuados, estériles
- 7.25. Termociclador a tiempo real
- 7.26. Centrífuga con rotor adecuado para eppendorf, que tenga la capacidad de alcanzar velocidades de 10000 xg
- 7.27. Cuba de electroforesis

8. REACTIVOS

- 8.1. Etanol 70%
- 8.2. Agua desionizada (según ES 01)
- 8.3. Caldo Agua de Peptona Buffereada
- 8.4. Caldo Tetrionato base Hajna
- 8.5. Cristales de yodo Nro. CAS 7553-56-2
- 8.6. Ioduro de potasio Nro. CAS 7681-11-0
- 8.7. Agua ultrapura estéril, alicuotada en tubos de 1,5 mL (según ES 01).
- 8.8. Kit de extracción de ADN de columna (membrana de sílice).
- 8.9. Mix de reacción de PCR con sonda, que incluya buffer de reacción, dNTP, ADN polimerasa Hot Start, cloruro de magnesio (tipo Quantinova, Quagen)
- 8.10. Sistemas de primers y sonda molecular beacon según Tabla 1
- 8.11. Cepa de referencia: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium ATCC14028 para control positivo de proceso
- 8.12. Cepa de referencia: *E. coli* ATCC25922 para control negativo del proceso
- 8.13. ADN de *Salmonella spp.* para control positivo de la reacción de amplificación, extraído a partir de la cepa de referencia

Tabla 1: Sistema de primers y sonda a emplear:

Secuencia target	Nombre Primer/sonda	Secuencia	Tamaño del producto esperado	Referencia
		5'- CTCACCAGGAGATTACAACATGG -3'		
ttrBCA	ttr6	5'-AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC -3'	95 bp	Environ. Sci. Technol. 2011, 45, 8996–9002
	ttr4	HEX 5'-CCAGGCGACCGACTTTTAGCCACT		
	ttrProbe	GACGAGCCTGG -3' DABCYL		

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material a emplear debe estar estéril (bolsas, tubos, puntas, placas de Petri).
- 9.2. Es imprescindible limpiar la mesada de trabajo, al iniciar el análisis, con etanol 70% y realizar el análisis microbiológico entre dos mecheros, para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.
- 9.3. Para evitar contaminaciones accidentales de ADN, la detección molecular de *Salmonella spp.* debe estar organizada y contenida en etapas metodológicas y siguiendo el flujo "hacia adelante" o de no retorno (forward flow) para el manejo de las muestras.
- 9.4. Las áreas de trabajo deben estar espacialmente separadas. Se recomienda la preparación de la mezcla de reacción en una cabina con lámpara UV destinada para tal fin, exclusivamente. El ADN se debe cargar en un área físicamente separada.
- 9.5. Previo al inicio del trabajo, dejar el material plástico estéril y las micropipetas expuestas durante 15 minutos al UV de la cabina de preparación de la reacción.
- 9.6. Los reactivos, en particular la ADN polimerasa, son sensibles al calor. La mezcla de reacción debe realizarse en frío, pues la enzima puede perder actividad, y con la mayor celeridad posible.
- 9.7. El agua ultrapura estéril sobrante debe eliminarse. El re-uso del sobrante es una de las principales causas de contaminación de la mezcla de reacción.
- 9.8. No se debe emplear las pipetas de toma de volúmenes de reactivos para cargar ADN, ya que puede ser una fuente de contaminación. Las pipetas para preparar la mezcla de reacción son de uso exclusivo y no deben emplearse para hacer tomas de volúmenes de muestras de otra índole, por los mismos motivos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Se extrae ADN a partir de la cepa de referencia *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028.
- 10.2. Se puede visualizar en gel. Se puede cuantificar espectrofotométricamente a 260 nm en cuveta de cuarzo con pase óptico de 10 mm. La concentración de ADN genómico se calcula según:

$$[\text{ADN}] \text{ ng}/\mu\text{L} = \text{Abs}_{260} * \text{FD} * 50$$

siendo

Abs_{260} la lectura espectrofotométrica en unidades de absorbancia a 260 nm

FD el factor de dilución de la muestra en agua libre de DNAsas

50 factor de corrección

Nota 1: Se puede cuantificar el ADN con otras metodologías, por ej. fluorométricamente.

- 10.3. Se recomienda verificar la calidad del ADN, considerando las siguientes relaciones de absorbancia:
- 260/280 nm se aceptan valores en el rango 1,8 a 2,0
 - 260/230 nm se aceptan valores en el rango 2,0 – 2,2

Nota 2: para profundizar en este aspecto, ver el SOP 5082UY Extracción de ADN de bacterias con kit comercial

- 10.4. Se lleva el ADN a una concentración de 10 ng/ μL . Se lo considera la dilución 0. A partir de esta dilución, se realizan al menos 6 diluciones seriadas en base 10, para cubrir el rango dinámico de 1 a 0,000001 ng/ μL . Se analiza de acuerdo a los puntos 11.19 a 11.25 de este procedimiento.
- 10.5. Se preparará una curva de calibración anual o cada 50 muestras, analizando cada punto al menos por duplicado. Se acepta como eficiencia de la reacción un rango de 80 a 120 %. El rango normalizado entre duplicados no debe superar el 15%. El r^2 de la ecuación de la recta debe ser $>0,98$. Idealmente, la separación entre un punto y el siguiente de la curva de calibración es de 3,3 Cq.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del Agua de Peptona Bufferada (BPW)

- 11.1. Adicionar 20 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclave y esterilizar en autoclave.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 3 meses.

Preparación Caldo Tetrionato base Hajna

- 11.4. Adicionar 45,75 g de caldo tetrionato a 480 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.5. Calentar con agitación frecuente y hervir por 1 minuto hasta que se disuelva completamente. NO SE AUTOCLAVA. Este es el caldo base.
- 11.6. Enfriar a 45-50°C aproximadamente. Justo antes de emplear, agregar 20 mL de la solución de yodo a los 480 mL del caldo base.
- 11.7. Preparar la solución de yodo de la siguiente forma: se pesan 2,46 g de Iodo Nro. CAS 7553-56-2 y 4 g de Ioduro de Potasio Nro. CAS 7681-11-0. Se disuelven en 20 mL de agua desionizada estéril.
- 11.8. Repartir 22,5 mL en tubos estériles con capacidad para 50 mL.
- 11.9. El caldo base puede almacenarse en heladera hasta 2 semanas, pero una vez agregada la solución de yodo debe usarse en el mismo día.

Análisis de la muestra

Pre enriquecimiento y enriquecimiento

- 11.10. Pesar $25 \pm 0,2$ g de muestra (como se recibe) directamente en una bolsa de Whirl-Pak estéril.
- 11.11. Agregar 225 mL de Agua de Peptona Buffereada y mezclar por 60 s a 150 rpm.
- 11.12. Incubar a 35 ± 1 °C, por 22 ± 2 h.
- 11.13. Luego de incubar, homogeneizar manualmente, mezclando gentilmente.
- 11.14. Transferir asépticamente 2,5 mL del homogeneizado al tubo de Caldo Tetrationato Base Hajna.
- 11.15. Incubar a 35 ± 1 °C, por 22 ± 2 h.
- 11.16. Vortexear el tubo de 5 a 10 s.
- 11.17. Extraer ADN de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante del kit de extracción (ver SOP 5082UY).
- 11.18. Por cada batch de análisis, se deben incluir los controles explicitados en el capítulo 13 de este procedimiento, exceptuando el control negativo de proceso, que se realizará con frecuencia anual.

Detección y confirmación por Q-PCR

- 11.19. En la **zona exclusiva para reactivos** (preferentemente en cabina para PCR), fundir en hielo la mezcla de reacción (por ejemplo 2x QuantiNova Probe PCR Kit), los primers, la sonda y agua ultrapura estéril. Mezclar las soluciones individuales, inclinando suavemente los tubos hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Realizar un centrifugado rápido a cada tubo a los efectos de lograr una adecuada mezcla de reactivos.
- 11.20. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la Tabla 2. Planificar al menos 2 reacciones por cada muestra (duplicados), incluyendo un blanco de reactivos de PCR o Non Template Control (NTC) y un positivo de ADN. Preparar al menos un 10% adicional de la mezcla de reacción para paliar los errores de pipeteo cuando se alicuota la mezcla en los tubos de PCR.
- 11.21. Vortexear la mezcla de reacción y dispensar 23 µL en los tubos de PCR.

Componente	x1 reacción (en µL)
2x QuantiNova	12,5
Primer F ttr6 5 µM *	2
Primer R ttr4 5 µM *	2
Sonda 5 µM †	1
Agua ultrapura estéril	5,5
Volumen final	25

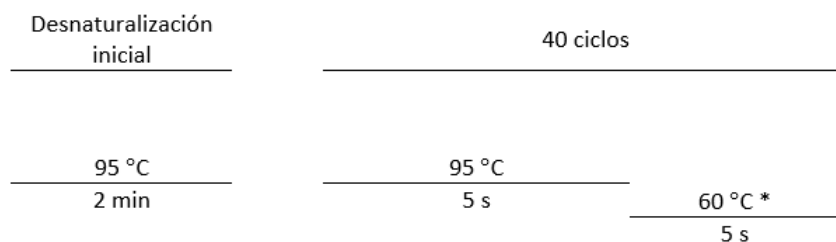
* Concentración final 0,4 µM

† Concentración final 0,2 µM

- 11.22. Cargar 2 µL del agua de reacción en el NTC.
- 11.23. Fuera de la cabina de preparación, en la zona exclusiva para ADN, fundir en hielo el ADN de las muestras y ADN control. Con una pipeta exclusiva para uso de ADN, agregar 2 µL de molde de ADN.

Nota 3: se sugiere emplear como ADN control un ADN de concentración conocida, por ejemplo 1 ng/µL, para que actúe como calibrador.

11.24. El ciclado térmico es el siguiente:



* adquisición de la fluorescencia

11.25. La adquisición se hace en el paso de extensión (60°C). Para el fluorosforo HEX, el máximo de absorción es de 538 nm y el máximo de emisión es de 555 nm. Se grafica la señal de fluorescencia vs. el número de ciclos. A partir de una curva de calibración de ADN, se fija el umbral y se interpola el C_q de las muestras.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Cada control que debe ser realizado presentado en el punto 13 de este procedimiento, tiene un valor de referencia. Si los resultados observados para cualquier control es diferente al valor esperado, se considerará si el análisis debe ser repetido.
- 12.2. Si los resultados observados para los controles son los esperados, cualquier valor de muestra cuyo C_q sea menor o igual el límite de detección instrumental será considerado como positivo, y se reportará como "*Salmonella spp.* detectada en 25 g de muestra".
- 12.3. Si los resultados observados para los controles son los esperados, y el valor de C_q de la muestra está por debajo del límite de detección instrumental, se deberá repetir la amplificación empleando diluciones de la muestra (1/5; 1/10), ya que en ocasiones grandes cantidades de ADN o inhibidores de la matriz pueden impedir la amplificación. Es recomendable además visualizar el ADN genómico en un gel de agarosa al 1% y cuantificarlo. Si luego de estas consideraciones, el valor de la muestra sigue estando por debajo del límite de detección instrumental, será considerado como negativo y se reportará "*Salmonella spp.* no detectada en 25 g de muestra".
- 12.4. El límite de detección instrumental se fija de acuerdo a los valores obtenidos en la curva de calibración durante la etapa de validación.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Cada vez que se analiza una muestra:

- 13.1. **Blanco de proceso:** Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en 225 mL de Agua de Peptona Buffereada. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser negativa o tener valores de C_q superiores al límite de detección instrumental. Los datos de este control se emplearán para realizar un gráfico de control.
- 13.2. **Control positivo de proceso:** Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en 225 mL de Agua de Peptona Buffereada, con una ansada de *Salmonella spp.* Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser positiva (valores de C_q menor o igual al límite de detección instrumental).
- 13.3. **Fortificación de una muestra:** Se realiza una muestra por duplicado, y a uno de los duplicados se le agrega una ansada de *Salmonella spp.* Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser positiva (valores de C_q menor o igual al límite de detección instrumental). Un resultado negativo indica que existe inhibición de la matriz en el crecimiento y/o de extracción de ADN.
- 13.4. **Non Template Control (NTC) o Blanco de PCR:** se incluye por duplicado un blanco de reactivos de PCR. La detección por PCR debe ser negativa o tener valores de C_q superiores al límite de detección instrumental.
- 13.5. **Control positivo de PCR:** incluir un ADN de *Salmonella spp.* de concentración conocida. La detección por PCR debe ser positiva (valores de C_q menor o igual al límite de detección instrumental).
- 13.6. El rango normalizado entre los duplicados de la PCR no debe superar el 15%. En caso de que así sea, se evaluará la pertinencia de repetir la muestra.

En forma anual:

13.7. **Control negativo de proceso:** Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en 225 mL de Agua de Peptona Buffereada, con una ansada de *E. coli*. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser negativa. La especificidad del sistema ha sido debidamente probada en bibliografía y verificada durante la validación. Por estas razones, realizar este control con una frecuencia anual.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. TMECC 07.02-B. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2001

14.2. Jyoti A., Vajpayee P., Singh G., Bali Patel C., Chand Gupta K., Shanker R. Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of *Salmonella Typhimurium* by Quantitative Polymerase Chain Reaction. 2011. Environ. Sci. Technol. 45: 8996–9002 [dx.doi.org/10.1021/es2018994](https://doi.org/10.1021/es2018994)

