

Higiene y Sanidad Ambiental, 19 (2): 1749-1754 (2019)

Implementación de una técnica de tamizaje para la identificación de *Salmonella* spp. en aguas superficiales

IMPLEMENTATION OF A SCREENING TECHNIQUE FOR THE IDENTIFICATION OF *SALMONELLA* SPP. IN SURFACE WATER

Lourdes BATISTA GUTIÉRREZ, Félix Manuel ROSADO GARCÍA, María Isabel GONZÁLEZ GONZÁLEZ, Alejandro VILLAR SAAVEDRA

Laboratorio de inmunología del departamento de Microbiología, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, Infanta No 1158 e/ Llinás y Clavel, Código Postal, La Habana, Cuba.

Correspondencia: Lourdes Batista Gutiérrez. Correo-e: lulybatista62@gmail.com

RESUMEN

Introducción: *Salmonella* spp. es uno de los patógenos más estudiados causantes de enfermedades de transmisión hídrica. La detección temprana previene la aparición de brotes y permite la toma de decisiones en Salud Pública. Los ensayos rápidos ofrecen detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos cortos y con metodologías sencillas respecto a los métodos convencionales. *Objetivos:* Implementar una técnica de tamizaje para la identificación de *Salmonella* spp. en muestras de aguas mediante ensayos inmunoenzimáticos. *Metodología:* Se realizó un estudio de desarrollo y evaluación tecnológica durante agosto - noviembre 2016 utilizando el paquete comercial RIDASCREEN *Salmonella*. Se analizaron un total de 50 muestras en 2 escenarios. El escenario 1 con aguas inoculadas con cepas de referencia en condiciones de laboratorio y el escenario 2 con aguas superficiales procedentes de los ríos. *Resultados:* Al comparar los resultados obtenidos por el método convencional en el escenario uno el 100% de las muestras fueron positivas no así en el escenario dos donde solo fueron positivas el 50% de las muestras, valores inferiores a los resultados del kit RIDASCREEN, donde se obtuvo un 72 %. El kit demostró una sensibilidad de 100% y una especificidad de 56%. La fuerza de concordancia del método fue valorada como moderada. *Conclusiones:* El método RIDASCREEN *Salmonella* logró una mayor positividad en muestras de laboratorio que en muestras de aguas superficiales procedentes de ríos. Los resultados obtenidos confirman que es un método de detección rápida y útil para el tamizaje inicial de muestras de agua en comparación con el método convencional.

Palabras clave: *Salmonella*, aguas superficiales, métodos rápidos, ELISA.

ABSTRACT

Introduction: *Salmonella* spp. is one of the most studied pathogens causing waterborne diseases. Early detection prevents the appearance of outbreaks and allows decision making in Public Health. Rapid tests use simple methodologies and provide detection, identification or microorganisms enumeration in short times in comparison with conventional methods. *Objectives:* To implement a screening technique for *Salmonella* spp. identification in water samples by immunoassays. *Methodology:* A development and technological assessment study was conducted during August to November 2016. In order to get this purpose, it was analyzed 50 samples by the RIDASCREEN *Salmonella* commercial kit taking into account two scenarios. Scenario 1: attacked waters at laboratory conditions and scenario 2: surface waters from rivers. *Results:* 100% of total samples were positive to *Salmonella* spp. in scenario 1 and 72% in scenario 2 using the RIDASCREEN *Salmonella* commercial kit, only 50% of total samples were positive to *Salmonella* spp. using the conventional method in scenario 2. The commercial kit showed 100% of sensitivity and 56% of specificity. The concordance force was considered as moderated. *Conclusions:* The

RIDASCREEN *Salmonella* commercial kit achieved greater positivity in attacked samples at laboratory conditions than those samples from surface waters. These results confirm that RIDASCREEN *Salmonella* is a useful method for initial screening of water samples.

Keywords: *Salmonella*, superficial water, rapid methods, ELISA.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad y el uso de agua dulce, así como la conservación de los recursos acuáticos, son fundamentales para el bienestar humano; sin embargo, tres millones de personas mueren cada año en países en desarrollo por enfermedades de transmisión hídrica, la mayoría niños menores de cinco años. Se ha estimado que la mitad de la población de esos países está expuesta a fuentes de agua contaminadas que aumentan la incidencia de enfermedades. Una de las fuentes de contaminación más frecuente es el vertido de residuos humanos a los ríos de aproximadamente dos millones de toneladas (Arrellano et al, 2012)

En la actualidad se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas a través de los alimentos y el agua (Crim et al, 2014; Scallan et al, 2011), dentro de este grupo de enfermedades se encuentra la salmonelosis, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), representa uno de los principales problemas en salud pública (Junta de Andalucía, 2012; Rincón Acero et al, 2011; St Louis et al, 1988).

El género *Salmonella*, es uno de los más estudiados entre los patógenos que pueden ser aislados del agua y los alimentos. Las bacterias de este género son una de las más complejas que existen hoy en día, es una de las principales causas de morbimortalidad en adultos y niños, y uno de los productores de toxiinfecciones de origen bacteriano más importantes en el mundo (St Louis et al, 1988; Robledo, 2015).

Los métodos de ensayo para la determinación de microorganismos patógenos en el agua no han variado mucho en los últimos años (Havelaar, 2001), principalmente para los indicadores bacterianos de contaminación fecal y por lo general se realizan por métodos convencionales (Fundora, 2013). El método convencional de cultivo utilizado en la actualidad es confiable, pero es un método extenso y laborioso que retrasa el tiempo de obtención de resultados. A estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha estimulado el desarrollo de métodos de detección más rápidos que pueden ser útiles en estudios de fuentes contaminadas y de brotes (dos Santos et al, 2006).

Por tal motivo se realiza la presente investigación con el objetivo de introducir una técnica de tamizaje en el diagnóstico de *Salmonella* spp en muestras de aguas superficiales mediante ensayos inmunoenzimáticos en la provincia La Habana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de desarrollo y evaluación tecnológica en muestras de aguas superficiales de La Habana durante el período agosto - noviembre de 2016. El estudio se llevó a cabo en seis ríos de La Habana donde se establecieron puntos de muestreo a partir de 20 km aguas adentro de la desembocadura. En los ríos Guanabo, Bacuranao, Cojímar y Las Lajas se tomaron muestras en 5 puntos de muestreo mientras que en los ríos Quibú y Almendares se tomaron muestras en 14 y 16 puntos de muestreo respectivamente. En total se tomaron 50 muestras de agua superficiales en los ríos antes mencionados. No se aplicaron técnicas de selección muestral, por lo que se trabajó con el 100 % de este universo. Las muestras fueron colectadas según métodos estándar según normas de agua potable y agua residuales (APHA, 2012; Oficina Nacional de Normalización, 2012), y procedimientos normalizados de operación para el muestreo (PNO de muestreo) del laboratorio de microbiología de aguas del INHEM (Laboratorio de Patógenos en Agua INHEM, 1998).

La totalidad de las muestras fueron enviadas a las Secciones de Aguas e Inmunología del Laboratorio de Microbiología Sanitaria del Instituto Nacional Higiene Epidemiología y Microbiología de La Habana las que fueron procesadas mediante el método inmunoenzimático ELISA (kit RIDASCREEN *Salmonella*, Art. No. R4201, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), y por las técnicas convencionales para el análisis cualitativo de *Salmonella* spp. según APHA (2012) y PNO-*Salmonella* del laboratorio de microbiología sección de aguas INHEM. (R-Biopharm, 2003; Oficina Nacional de Normalización, 2012), según el flujograma de la Figura 1.

Se tuvo en cuenta dos tipos de escenarios para el análisis de las muestras:

Escenario 1: Estuvo formado por una serie de pruebas replicadas utilizando un panel de 6 diluciones a partir de tres cepas ATCC del género *Salmonella* (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Arizonae cepa salvaje).

Escenario 2: Muestras procedentes de los ríos anteriormente señalados.

Para la recolección y procesamiento de la información se creó una base de datos en SPSS versión 20 con los resultados obtenidos por el método convencional y por el método de ELISA RIDASCREEN *Salmonella*. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el mismo programa estadístico. Para describir el comportamiento de las variables, se

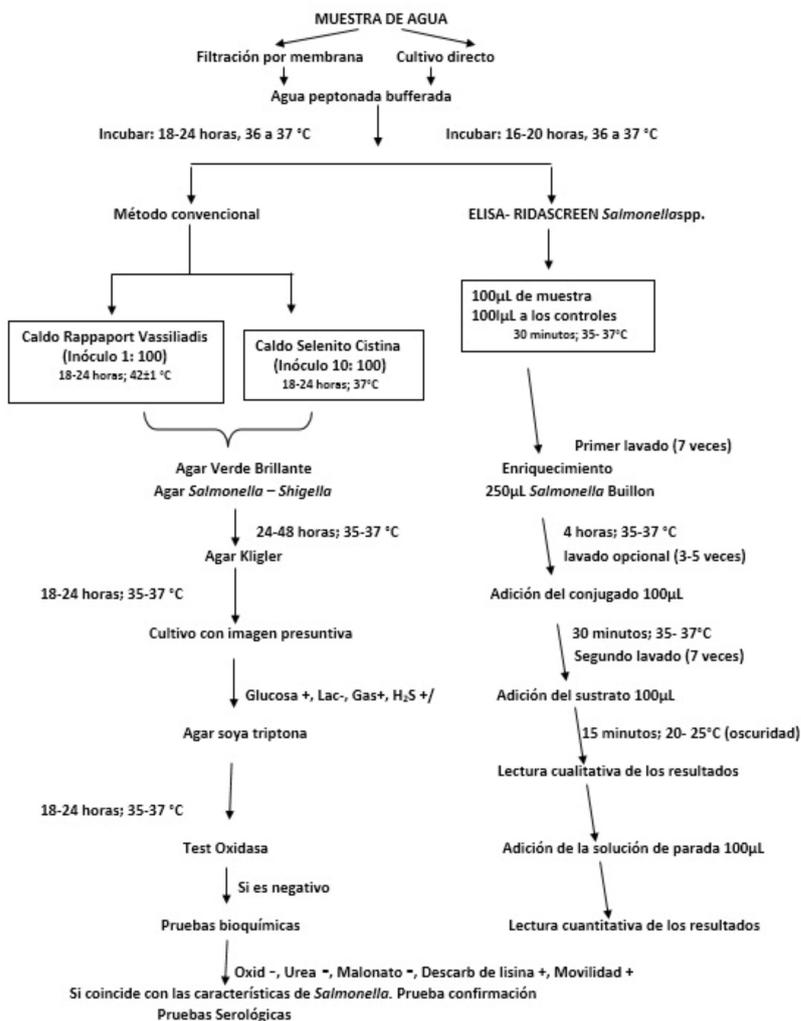


Figura 1. Flujograma de trabajo.

utilizaron medidas de resumen para las variables cualitativas como frecuencias absolutas y porcentaje, se confeccionaron tablas de contingencias calculando la sensibilidad y especificidad de las pruebas, tomando como prueba de oro la convencional. Para el cálculo de los valores predictivo positivo y predictivo negativo se utilizaron fórmulas matemáticas y para medir la concordancia de los resultados entre los medios diagnósticos empleados (convencional y ELISA) se utilizó el índice kappa.

Valor Kappa	Fuerza de concordancia
≤ 0.20	Pobre
0.21-0.40	Baja
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Fuerte
0.81-1	Muy fuerte

RESULTADOS

El 100% de las muestras analizadas por el método convencional en el escenario 1, fueron positivas y en el escenario 2 solo el 50% de las muestras resultaron positivas (Tabla 1).

Se obtuvo una sensibilidad de 100% y una especificidad de 56%, la fuerza de concordancia del método fue de 0.56 (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos por el método convencional en ambos escenarios el 100% de las muestras fueron positivas en el escenario 1 y solo el 50% de las muestras en el escenario 2, valores inferiores a los resultados del kit RIDASCREEN, donde se obtuvo un 100 % y un 72 % respectivamente.

Con los resultados obtenidos el método puede ser efectivo para el diagnóstico de *Salmonella* spp. en muestras de agua.

A pesar que en la bibliografía consultada no se relacionan estudios que utilicen el kit RIDASCREEN para el diagnóstico de *Salmonella* spp. en muestras de aguas superficiales, lo que limita

establecer comparaciones; algunos autores como Bayona et al., 2014 lo han utilizado en otros tipos de muestras.

Otros estudios tipo ELISA se han utilizado para la determinación de microorganismos diferentes a *Salmonella* spp. en muestras de agua, lo que demuestra la utilidad de este método para el diagnóstico rápido.

Sánchez y cols. utilizaron la técnica de ELISA para la detección de *Entamoeba histolytica* en agua, la metodología fue estandarizada en muestras de agua sintética con un 90% sensibilidad y un 100% especificidad y posteriormente, aplicada en muestras ambientales. De acuerdo a los resultados, esta metodología puede aplicarse para determinar la contaminación por amebas en aguas naturales y aguas residuales, que pueden estar relacionadas con fuentes de abastecimiento y distribución de agua para uso y/o consumo humano (Sánchez et al 2000).

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos del Kit RIDASCREEN *Salmonella* y el método convencional en dos tipos de escenarios.

<i>Método ELISA</i>	<i>Escenario 1</i>		<i>Escenario 2</i>	
	<i>Número de muestras</i>	<i>% de muestras</i>	<i>Número de muestras</i>	<i>% de muestras</i>
Negativas	0	-	14	28
Positivas	18	100	36	72
Total	18	100	50	100
<i>Método convencional</i>				
Presencia	18	100	25	50
Ausencia	-	-	25	50
Total	18	100	50	100

Tabla 2. Tablas de contingencias comparativas entre los resultados del método convencional y ELISA en la detección de *Salmonella* en agua de río. INHEM, 2016.

		<i>Resultados del método convencional</i>			
		Presencia		Ausencia	
		No.	%	No.	%
<i>Resultado del método ELISA</i>	Prueba positiva	25	100	11	44
	Prueba negativa	0	0	14	56
Total		25	100	25	100
<i>Sensibilidad</i> = fracción de verdaderos positivos		100%			
<i>Especificidad</i> = fracción de falsos positivos		56%			
<i>Kappa</i> = fuerza de concordancia		0.56			
<i>VPP</i> =valor predictivo positivo		69.4%			
<i>VPN</i> =valor predictivo negativo		100%			

En muestras de alimentos también se ha ensayado la detección de *Salmonella* spp. Plaza Ibarra y cols., (2013) utilizaron un método rápido de diagnóstico y encontraron la presencia de *Salmonella* spp. en el 10% de las muestras de alimentos analizadas. (Plaza et al, 2013).

Dos Santos et al (2006) en un estudio de detección de *Salmonella* spp. en carne de pollo evaluó un método de ELISA indirecto frente al método de referencia convencional. De 35 muestras positivas para *Salmonella* mediante el método convencional, 33 fueron positivas por ELISA, método que mostró una sensibilidad y especificidad del 94%, y valores predictivos positivos y negativos de 82% y 98%, respectivamente.

Al analizar los conceptos de sensibilidad y especificidad y valorar las tablas de contingencia comparativas entre los resultados del método convencional y ELISA se identificaron 25 muestras con presencia del patógeno, de ellas 25 verdaderos positivos, 11 falsos positivos y 14 verdaderos negativos. Se determinó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 56% con un valor predictivo

positivo (VPP) de un 69.4% y un valor predictivo negativo (VPN) de un 100%, la fuerza de concordancia del método fue valorada como moderada.

En la presente investigación la sensibilidad del método Ridascreen *Salmonella* fue de un 100%, esto pudiera permitir la toma de acciones de salud pública en estudios de brotes o conflictos.

Es válido destacar que la especificidad del 56% obtenida en la presente investigación difiere en menor proporción a lo señalado por los fabricantes y se pudiera plantear como posible hipótesis la existencia de reacciones cruzadas a microorganismos propios del ecosistema local o la existencia de condiciones a nivel de los ríos que hacen que *Salmonella* spp. tengan un comportamiento diferente a las condiciones de laboratorio.

En la mayoría de los ríos de La Habana recalán gran cantidad de contaminantes con concentración de materia orgánica; existen microorganismos capaces de crecer con concentraciones muy bajas en nutrientes, mientras que otros se adaptan a altos contenidos. La presencia de enzimas o sustancias bactericidas,

generalmente producto del metabolismo de animales y plantas, también puede condicionar las poblaciones microbianas, elementos a tener en cuenta a la hora del diagnóstico de determinados microorganismos en matrices acuáticas (Chabalina et al, 1997; Moreno et al, 1998).

Por otro lado, los factores biológicos también afectan a los microorganismos acuáticos, en el sentido de que los individuos componentes de una comunidad microbiana pueden ayudarse o inhibirse entre sí. La competencia por los nutrientes, entre los propios microorganismos y con otros seres superiores, es de gran importancia, así como el hecho de que muchos microorganismos son parasitados y fagocitados por otros. (Moreno et al, 1998).

Además de los factores físicos y químicos, algunas especies sintetizan sustancias bactericidas o bacteriostáticas, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Este es el caso por ejemplo de los antibióticos producidos por los hongos, que no son perjudiciales para ellos mientras que son letales para las bacterias. (Moreno et al, 1998).

A pesar de esos resultados de baja especificidad, el método puede ser usado en el tamizaje de muestras de agua para la posterior confirmación con el método convencional.

CONCLUSIONES

Mediante el método RIDASCREEN *Salmonella* se logró una mayor positividad en muestras de laboratorio que en las muestras de agua superficiales procedentes de ríos. Los resultados obtenidos confirman que es un método de detección rápida y útil para el tamizaje inicial de muestras de agua en comparación con el método convencional.

BIBLIOGRAFÍA

Arrellano Aguilar O, Ortega Elorza L, Gesundheit Montero P. (2012). Estudio de la contaminación en la cuenca del río Santiago y la salud pública en la región. Julio, México DF. http://www.greenpeace.org/mexico/global/mexico/report/2012/9/informe_toxicos_rio_santiago.pdf

Bayona M, Celemín J, Contreras G. (2014). Prevalencia de *Salmonella* spp., en niños de jardines infantiles de una localidad de Bogotá, Colombia. *Rev Venezolana de Salud Pública*, 2(1): 9-13. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4769551>

Chabalina L, Beltrán González J. (1998). Contaminación marina en bahías y zonas costeras de Cuba y del gran Caribe. <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/peru/cubcca005.pdf>

Moreno Merino L, Navarrete Martínez P, Virgós Soriano L. (1998) Comportamiento de los microorganismos en el agua subterránea. Conceptos básicos de Microbiología sanitaria.

http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib8/3_comp orta.pdf

Crim SM, Iwamoto M, Huang JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist, et al. (2014) Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(15): 328-32. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6315a3.htm>

dos Santos A, Lameiro K, Chemello D, Tondo EC, Zacchia MA, Guimarães JA. (2006) Evaluation of an indirect ELISA for the detection of *Salmonella* in chicken meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:[About 9p.]. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151783822006000300027&script=sci_arttext

Fundora Hernández H, Puig Peña Y, Chiroles Rubalcaba S, Rodríguez Bertheau A M, Gallardo Díaz J, Milián Samper Y. (2013) Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Rev Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51 (1): 84-96. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1561-30032013000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es0

Havelaar A, Blumenthal U J, Strauss M, Kay D, Bartram J. Guidelines: the current position. In: Fewtrell L, Bartram J, eds. *Water Quality: (2001) guidelines, Standards and Health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious diseases.* London: IWA-Publishing. P. 440.

Junta de Andalucía. Delegación de Medio ambiente. (2012). Protocolo de vigilancia y alerta de salmonelosis. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p_4_p_1_vigilancia_de_la_salud/protocolos_actuacion_2012/pr_salmonelosis12.pdf

Oficina Nacional de Normalización. Agua Potable-Requisitos Sanitarios. 2 ed. Cuba, NC 827. (2012). 12. Laboratorio de patógenos en agua INHEM. Procedimientos para el análisis cualitativo de *Salmonella* ss. Enero-1998. 1ª ed.

Plaza Ibarra LA. (2013). Análisis microbiológico en quesos frescos que se expenden en supermercados de la ciudad de Guayaquil, determinando la presencia y ausencia de *Listeria* y *Salmonella*. [Tesis]. [Internet]. Guayaquil: Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción Ecuador. <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1520/1/T1416.pdf>

R-Biopharm AG, KIT- RIDASCREEN *Salmonella*. (2003) método inmunoenzimático para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos y muestras ambientales. (Art. No. R4201) producido en R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Certificado y Validado por AFNOR siguiendo las NF ISO - 16140 R-Biopharm AG. <http://nf->

- validation.afnor.org/en/wp_content/uploads/sites/2/2014/03/RBP-31-01-06-08_en.pdf
- Rincón Acero D P, Ramírez Rueda R Y, Vargas Medina J C. (2011) Transmisión de *Salmonella* entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Rev. Salud UIS*, *43* (2): 167-177. <http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v43n2/v43n2a08.pdf>
- Robledo López A. (2015) Investigación de *Salmonella* spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. [Tesis]: Universidad Politécnica de Catalunya (ESAB). <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/26111/memoria.pdf>
- Sánchez J. J, Bravo L.A, García J. L, de Tejada A. L. Implementación de un método inmunológico (ELISA) para detección de contaminación por amebas en agua superficial. XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria e Ambiental. <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/saneab/vii-031.pdf>
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. (2011) Food borne illness Acquired in the United States - major pathogens. *Rev Emerg Infec Dis*, *17*(1):7-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375761/>
- St Louis ME, DL Morse, ME Potter, TM DeMelfi, JJ Guzewich, RV Tauxe, et. al. (1988) The Emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* enteritidis infections: new implications for the control of salmonellosis. *JAMA*. *259*(14): 2103-107. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=371461>