

VALIDACIÓN *In silico* DE OLIGONUCLEÓTIDOS-PRIMERS PARA LA DETECCIÓN ESPECIFICA DE *Salmonella* spp. MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

In silico VALIDATION OF PRIMER-SET FOR THE SPECIFIC DETECTION OF *Salmonella* spp. BY CONVENTIONAL POLYMERASE CHAIN REACTION.

Mauricio E. Orozco-Ugarriza^{1,2,4*}, Piedad A. Franco-Anaya^{1,2}, Yenifer Olivo-Martínez^{1,2,3}

Resumen

Salmonella es un patógeno transmitido por el consumo de alimentos y agua contaminada, de elevada prevalencia. Los métodos convencionales para la detección de esta bacteria patógena requiere procedimientos, que involucran etapas de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo e identificación bioquímica, las cuales son sumamente laboriosas, consumen mucho tiempo y poco sensibles. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F propuestos por Rahn *et al.*, (1992) para la detección y amplificación del gen *InvA* de *Salmonella* spp. El análisis, verificación y validación *in silico* de oligonucleótidos a través de algoritmos computacionales y empleando la reacción en cadena de polimerasa *in silico*, son una alternativa que permite aceptar o rechazar los pares de cebadores potenciales para la PCR sin desperdiciar ningún producto químico, así como el costo relacionado.

Palabras clave: *Salmonella*, PCR-*In silico*, Gen *InvA*.

© 2016 Orozco-Ugarriza *et al.* Este es un artículo Open Access distribuido bajo la licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, su distribución se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Abstract

Salmonellae are one of the most prevalent water and food borne pathogens. The conventional methods for detection of these pathogenic bacteria involve several rounds of selective enrichment and biochemical identification which are laborious, time consuming, and less sensitive. To evaluate the oligonucleotides computationally 139 -R and 141 -F published by Rahn *et al.* (1992) for specific detection, identification and amplification for nucleotide sequences within the *invA* gene of *Salmonella* spp. *In silico* analysis, verification and validation of oligonucleotides through computational algorithms and using *in silico* polymerase chain reaction, they are an alternative that allows to accept or reject potential pairs of PCR primers without wasting any chemical, as well as the related cost

Keywords: *Salmonellae*, *In-silico* PCR, *invA* gene.

© 2016 Orozco-Ugarriza *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). Commercial use of the original work or the possible derivative works is not allowed, its distribution must be done with a license equal to that which regulates the original work.

Recibido para publicación: 16 de Noviembre, 2016 - Aceptado para publicación: 14 de Diciembre, 2016

1 Universidad de San Buenaventura, Cartagena – Colombia.

2 Grupo de investigación en Microbiología y Ambiente (GIMA), Cartagena – Colombia.

3 Corporación para el desarrollo de la Investigación en Biomedicina & Biotecnología. Grupo de investigación traslacional en Biomedicina & Biotecnología (GITB&B). Colombia.

4 Universidad del SINÚ EBZ Seccional Cartagena. GIBACUS - Grupo de investigaciones Básicas y Clínicas de la Universidad del SINÚ. Cartagena – Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: mauricioorozcou@gmail.com - morozcou@usbctg.edu.co

Introducción

Las enfermedades producidas por el consumo de alimentos contaminados (ETA's) a nivel mundial, han tomado relevancia durante los últimos años por la cantidad de casos que se reportan a diario en distintas partes del mundo (Torrens *et al.*, 2015). Existen muchos microorganismos involucrados en la etiología de estas enfermedades, dentro de los aislados con mayor frecuencia se encuentran las bacterias del género *Salmonella* transmitida de los animales al ser humano tanto por la vía fecal-oral, como por alimentos y agua; los cuales son un grupo de bacilos gramnegativos capaces de infectar a una gran variedad de vertebrados. Las infecciones generadas en humanos por este tipo de bacterias, siguen siendo un problema para la salud pública en todo el mundo, asociadas a una elevada morbimortalidad por enfermedad diarreica en lactantes, niños y ancianos (Varela, Lavalle, & Alvarado).

El género *Salmonella* consta de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, siendo esta última la que se divide en seis subespecies: “*S. enterica*, subesp. *enterica*, *S. enterica*, subesp. *salamae*, *S. enterica*, subesp. *arizonae*, *S. enterica*, subesp. *diarizonae*, *S. enterica*, subesp. *houtenae* y *S. enterica*, subesp. *Indica*.” Para el esquema de Kauffman White mencionan la existencia de 2541 serovariedades. Se han reportado casos de infección en la avicultura por *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (Brenner, Villar, Angulo, Tauxe, & Swaminathan, 2000; Su & Chiu, 2007; Tindall, Grimont, Garrity, & Euzéby, 2005). Algunos roedores como las ratas actúan como vectores y reservorios, lo que se convierte en un gran problema, por la estrecha relación que tienen estos animales con las aves de corral (Espinal Marin, Prieto Suárez, Otero Jiménez, & Máttar Velilla, 2006; Terrier & Martínez, 2006; Uribe & Suárez, 2006).

Actualmente existen diversas técnicas altamente sensibles y rápidas para la identificación de *Salmonella* spp. como la técnica de aglutinación en placa, microaglutinación, pruebas de anticuerpos fluorescentes, prueba de inmunofluorescencia, y prueba de microantiglobulina. La recuperación de *Salmonella* sp. se dificulta porque: primero, no es detectable en alimentos que tienen un bajo número de células y segundo, los métodos tradicionales para la recuperación del microorganismo, aislamiento en medios selectivos, posterior identificación

bioquímica y caracterización serológica, tienen baja especificidad, sensibilidad y consumen mucho tiempo. Sin embargo, los avances en el campo de la genómica han llevado a que los métodos de diagnóstico basados en la amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), superen las dificultades que afectan la eficacia en la detección de patógenos presentes en los alimentos por métodos microbiológicos convencionales, siendo actualmente el método más eficaz para la detección de este microorganismo en muestras de alimentos y de cualquier naturaleza biológica (Acosta, Pinedo, Hernández, & Villarreal, 2013; Pedraza, Sanandres, Varela, Aguirre, & Camacho, 2014).

La sensibilidad y especificidad de la PCR depende en gran parte de la adecuada elección del blanco de amplificación (target gen), para el género *Salmonella*, el gen *invA* ha sido tradicionalmente utilizado para su detección en muestras de alimentos, debido a que está ampliamente conservado entre las especies del género *Salmonella*; Este gen es un factor de virulencia relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal y expresado en otros enteropatógenos como *Shigella* spp. durante el proceso de infección. El gen *invA* es común en todas las infecciones por cepas de *Salmonella* invasoras, por tanto, puede asociarse con posibles cuadros virulentos. Este codificado en el cromosoma bacteriano la región denominada isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1). Esta isla codifica, entre otros, proteínas del sistema de secreción tipo III (Chacón, Barrantes, García, & Achí, 2010).

La técnica de PCR presenta ventajas sobre los métodos convencionales en términos de rapidez, alta especificidad y sensibilidad. Los oligonucleótidos-primers utilizados para amplificar y detectar cualitativamente los genes diana en el ensayo de PCR requieren la validación experimental, lo cual no sólo requiere mucho tiempo y es costoso sino también propenso a fallas debido a la ausencia de especificidad.

El análisis, verificación y validación *in silico* de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR, a través de algoritmos computacionales, es una alternativa que permite a los investigadores aceptar o rechazar los pares de cebadores potenciales para la PCR experimental *in vitro* sin desperdiciar ningún producto químico, así como el costo relacionado. Por tanto, el objetivo de esta

investigación fue evaluar la capacidad de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F propuestos por Rahn *et al.*, (1992) para la detección y amplificación del gen *InvA* de *Salmonella* spp. empleando la reacción en cadena de polimerasa *in silico*.

El Alineamiento de Secuencia Múltiple fue codificado por color de acuerdo con la conservación, editado y manipulado manualmente con Jalview (<http://www.jalview.org/>) (Waterhouse, Procter, Martín, Clamp, & Barton, 2009).

Diseño Metodológico

Recuperación de secuencias genéticas.

La secuencia nucleotídica del gen de invasividad *InvA* de *Salmonella* se recuperó del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), Centro Nacional de Información Biotecnológica, Bethesda, MD, EE.UU. El alineamiento múltiple de las secuencias recuperadas del gen *InvA* se llevó a cabo utilizando www.ebi.ac.uk/clustalW para encontrar regiones consenso y verificar el grado de conservación del gen *InvA* en *Salmonella* spp.

Selección de Oligonucleótidos.

La secuencia del oligonucleótido-primers seleccionada para la amplificación del gen *InvA* de *Salmonella* spp. se tomó de Rahn *et al.*, (1992). Las características respecto composición de la secuencia y posición genómica de unión se detallan en la Tabla 1.

Evaluación computacional de oligonucleótidos.

El análisis *in silico* de las características fisicoquímicas de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F, se determinó con los parámetros de diseño de cebadores correspondientes a especificidad, temperatura de fusión,

Tabla N° 1. Secuencia de nucleótidos del oligonucleótido-primers y localización genómica del sitio de amplificación en el gen *InvA* de *Salmonella* spp.

Nombre	Secuencia*	Posición**
InvA139R	5'- GTGAAATTA TCGCCACGTTCCGGGCAA - 3'	2891887 - 2891908
InvA 139F	5'- TCA TCGCACC GTCAAAGGAACC - 3'	2892171 - 2892146

* Secuencia de oligonucleótidos-primers tomada de Rahn *et al.*, (1992).

** Posición del gen *InvA* con respecto a la secuencia reportada por Parkhill *et al.*, (2001) en el GenBank (NC_003198.1).

Tabla 2. Criterios para el diseño de oligonucleótidos-primers.

Criterio	Descripción
Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud Generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Temperaturas de fusión (Tm)	50-65 °C
Contenido %GC	40-60%
Auto-complementariedad	Debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
Similaridad	Debe tener 100% de apareamiento con el molde

Fuente: Modificado de Abd-Elsalam (2003).

contenido de GC, longitud del amplicón, formación de estructuras secundarias, secuencias de los extremos 3', etc. (Ver Tabla 2). Mediante el programa OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>), se obtuvieron los valores de estabilidad termodinámica (energía libre de Gibbs; ΔG°) de las interacciones detectadas entre cebadores (formación de horquillas, homodímeros o heterodímeros) que pueden dar lugar a errores en las reacciones de PCR.

La especificidad de los cebadores a nivel de especie se verificó mediante la realización de la BLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Wéry *et al.*, 2008), para determinar la complementariedad de las bases nucleotídica entre las secuencias del gen *InvA* y las secuencias de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F tomadas de Rahn *et al.*, (1992), para asegurarse que no haya homología con otros géneros o especies.

PCR *in-silico*

La selectividad de los oligonucleótidos se determinó empleando 45 genomas de *S. enterica* subgrupos I, II, IIIa, IIIb, IV, mediante PCR *in silico* (<http://insilico.ehu>) utilizando cebadores diseñados previamente y publicados por Rahn *et al.*, (1992), con el fin de asegurar que cada par de cebadores amplificará la secuencia diana en la región conservada del gen seleccionado y predecir el resultado del producto de amplificación y sus secuencias de ADN. Los resultados para este ensayo se ilustran a través de simulaciones de electroforesis de movilidad.

Resultados

Las características termodinámicas de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F propuestos por Rahn *et al.*, (1992), así como sus respectivas secuencias diana y productos de amplificación se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F.

Característica	InvA139R	InvA139F
Secuencia	5'- GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA -3'	5'- TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C -3'
Longitud	26 pb	22 pb
%GC	50 %	54.5 %
Tm°C	76.5	72.4
PM	7995.2 g/mole	6673.4 g/mole

%GC: Relación Contenido Guanina - Citosina. Tm°C: Temperaturas de fusión. PM: Peso Molecular. Fuente: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>

Tabla 4. Formación de dímeros y horquillas entre las parejas de oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F.

Oligonucleótidos	(ΔG°)* kcal/mol.	Nº de HTD	Nº de HMD	Horquillas**
139-R	-54.5 kcal/mol.	20	19	1 (-1.97/ 45.5°C)
				2 (-1.13 / 33°C)
141-F	-44.66 kcal/mol.		11	1 (-0.87/ 37.5)

HMD= Homodímero, HTD= heterodímero.

*Estabilidad termodinámica definida por energía libre de Gibbs (ΔG°) en kcal/mol. Valores por defecto: concentración de Na + 0,25 μ M; concentración de oligonucleótidos 0,25 μ M.

**Relación de valores: nº de estructuras terciarias (ΔG° de la más estable/temperatura de formación de dicha estructura). Valores por defecto: temperatura 25°C; concentración de Mg2+ 0 mM; concentración de Na + 0,25 μ M; concentración de oligonucleótidos 0,25 μ M; límite de plegamientos, 20.

Fuente: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>.

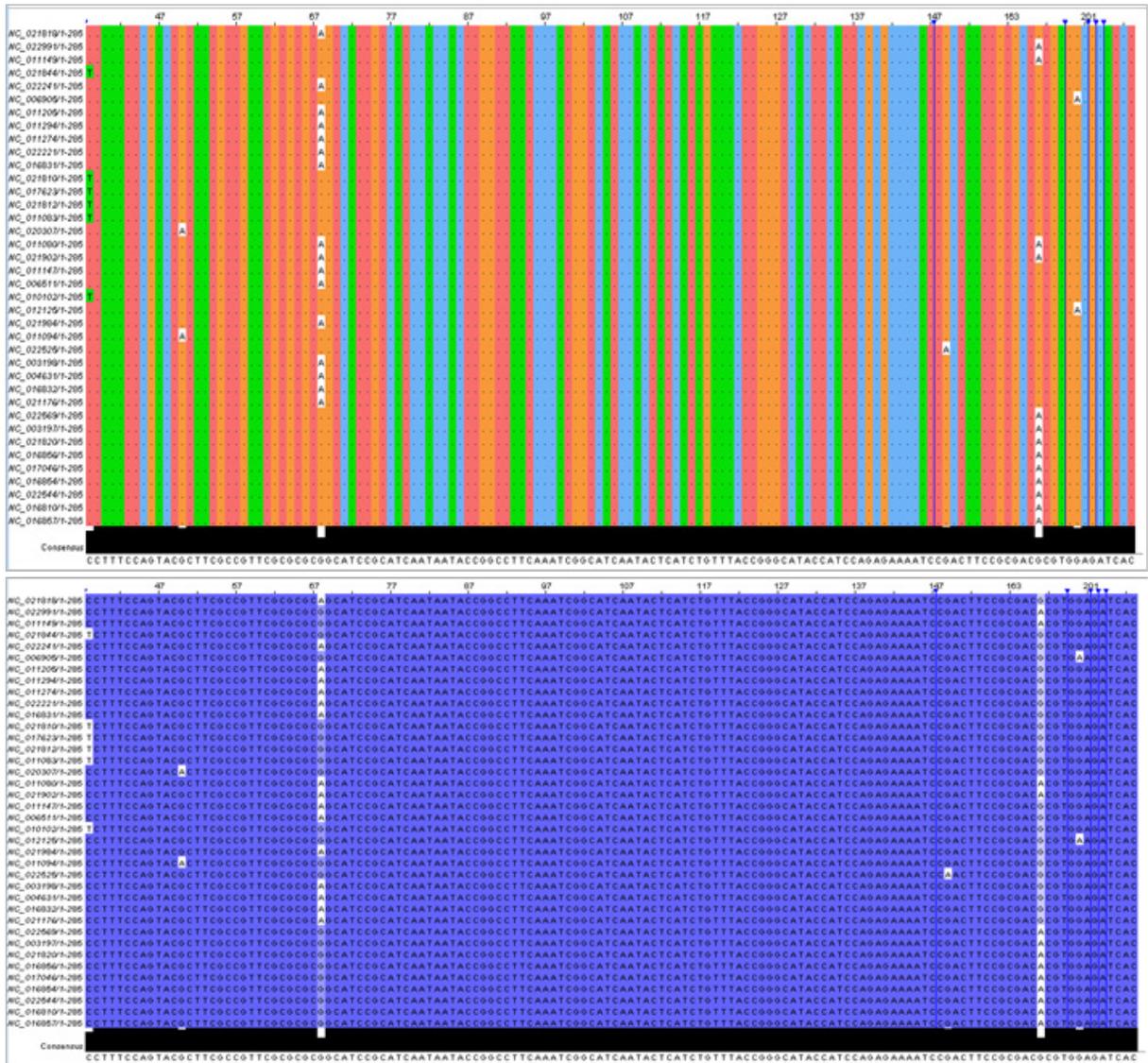


Figura 1. A) Fragmento del alineamiento de secuencias del gen *InvA* de diferentes subspecies de *Salmonella*. Un punto (.) en la secuencia indica un nucleótido idéntico con la secuencia consenso. B) En color azul parte de la secuencia que está absolutamente conservada.

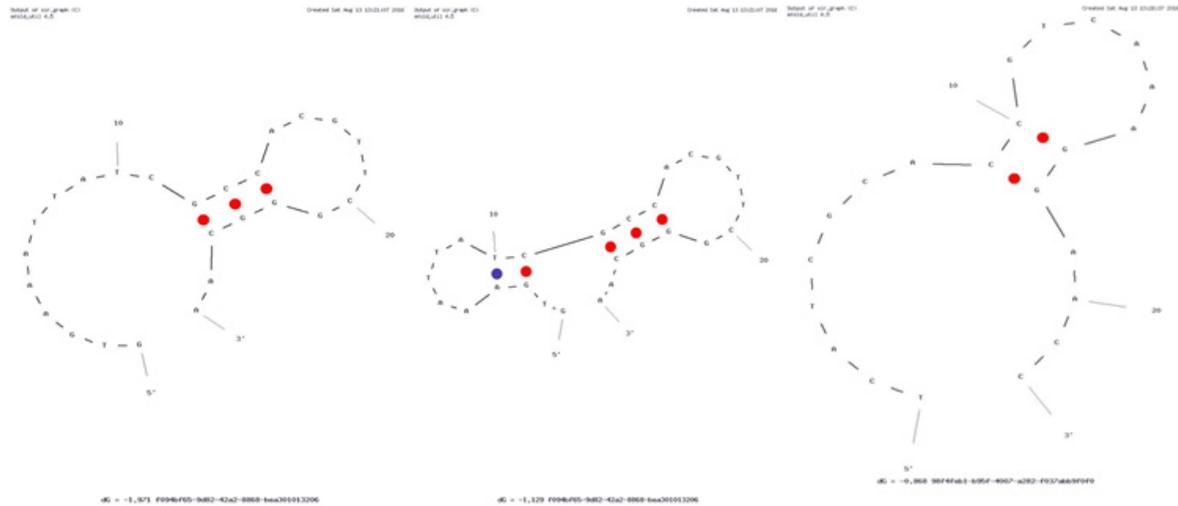
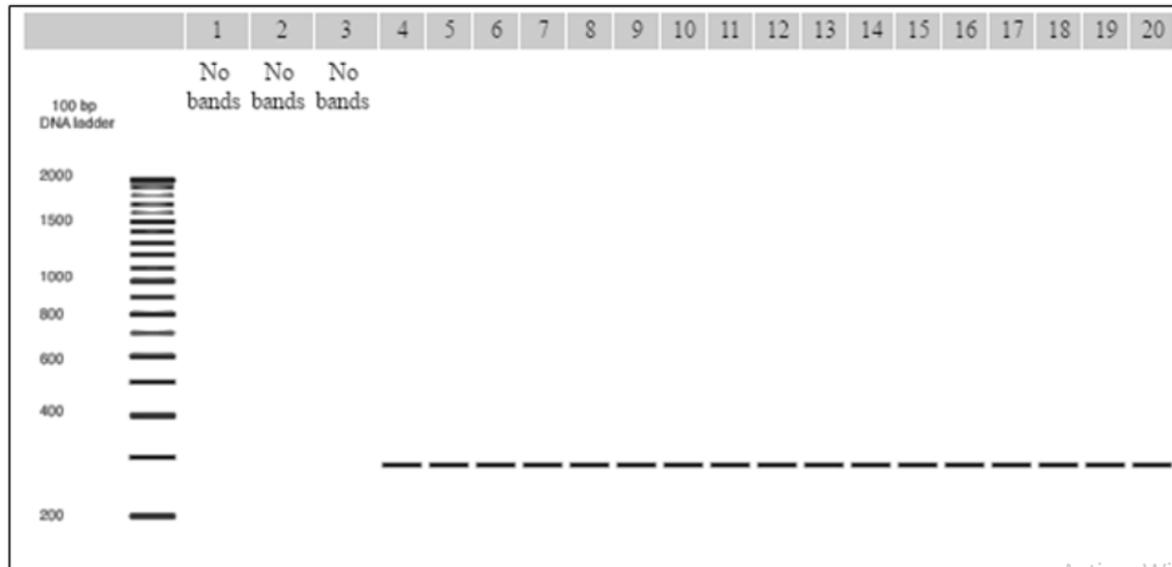


Figura 2. A – B) Formación de dímero o estructura secundaria para el oligonucleótido 141-R. C) Formación de dímero o estructura secundaria para el oligonucleótido 141-F.

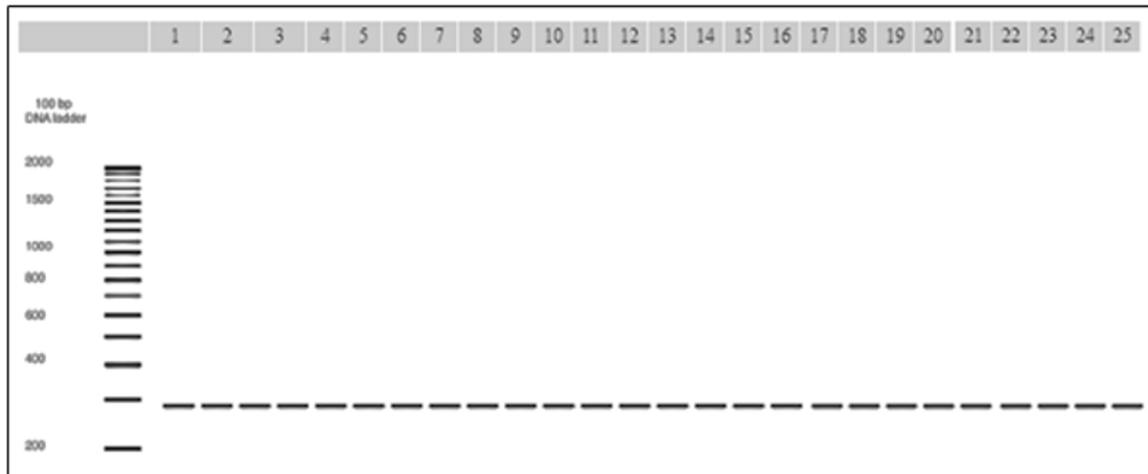
Figura 3. Ensayo de selectividad de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F del gen *InvA* en bacterias del género *Salmonella* spp.



- 1 - *Salmonella bongori* N268-08. 2 - *Salmonella bongori* NCTC 12419. 3 - *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* serovar 62:z4,z23:-.
- 4 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar cubana str. CFSAN002050. 5 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona str. 24249.
- 6 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona str. SL483. 7 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bareilly str. CFSAN000189.
- 8 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bovismorbificans str. 3114. 9 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis str. SC-B67.
- 10 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin str. CT_02021853. 11 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis str. P125109.
- 12 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum str. 287/91. 13 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum/pullorum str. CDC1983-67.
- 14 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum/pullorum str. RKS5078. 15 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg str. 41578.
- 16 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg str. B182. 17 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg str. CFSAN002069.
- 18 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg str. SL476. 19 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Javiana str. CFSAN001992.
- 20 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport str. SL254.

Fuente: http://insilico.ehu.eus/PCR/Amplify_show_result.php?sdvmlu15JOh092

Figura N°4. Ensayo de selectividad de los oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F del gen *InvA* en bacterias del género *Salmonella* spp.



1 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport str. USMARC-S3124.1. 2 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A str. AKU_12601. 3 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A str. ATCC 9150. 4 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B str. SPB7. 5 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi C strain RKS4594. 6 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum str. S06004. 7 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund str. CVM19633. 8 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thompson str. RM6836. 9 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi. 10 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2. 11 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. P-stx-12. 12 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. Ty21a. 13 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT104. 14 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2. 15 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. 08-1736. 16 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. 14028S. 17 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. 798. 18 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. D23580. 19 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. DT2. 20 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. SL1344. 21 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. ST4/74. 22 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. T000240. 23 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. U288. 24 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. UK-1. 25 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. 5- str. CFSAN001921

Fuente: http://insilico.ehu.es/PCR/Amplify_show_result.php?sdvwmwlu15JOh092

La predicción de estructuras secundarias se resume en la Tabla 4, se presentan los valores de estabilidad termodinámica (ΔG°) de las interacciones entre cebadores (formación de horquillas, homodímeros o heterodímeros). En las parejas de cebadores 139-R y 141-F pueden producirse heterodímeros más o menos estables con valores de estabilidad altos a diferentes temperaturas, es decir, con energía libre de Gibbs cercana a 0. Ninguna de las horquillas que pueden formar los cebadores seleccionados implica un riesgo a considerar en las reacciones de PCR (Ver Figura 2).

Para garantizar que los oligonucleótidos-primers seleccionados amplifican la región genómica de interés, se evaluó la especificidad para la detección y amplificación del gen *InvA* de *Salmonella* spp. En general, el par de oligonucleótidos-primers 139-R y 141-F, produjeron un porcentaje de identidad (identity) y de cobertura de la secuencia diana

(query coverage) del 100%, el oligonucleotido-primers sentido produjo un E-value de $2e-04$, mientras que el oligonucleótido-primers antisentido produjo un E-value de 0.022 para 100 secuencias parciales de la proteína *InvA* o genomas completos de *Salmonella enterica*. Los números de acceso de las secuencias son los siguientes: KJ718879.1, CP019442.1, CP019405.1, CP019035.1, CP016837.1, CP019206.1, CP019204.1, CP019183.1, CP019185.1, CP019198.1, CP019196.1, CP019194.1, CP019192.1, CP019184.1, CP019179.1, CP019178.1, CP019177.1, CP019176.1, CP019172.1, CP016406.1, CP016412.1, CP013685.1, CP016014.1, CP016012.1, CP016010.1, CP015924.1, CP015923.1, CP016357.1, CP017728.1, CP017727.1, CP017723.1, LT571437.1, CP015724.1, CP007584.2, CP014979.1, CP014977.1, CP014975.1, CP014969.1, CP014967.1, CP014965.1, CP014983.1, CP014982.1, CP014981.1, CP014666.1, CP014665.1, CP014664.1, CP014663.1, CP014661.1, CP014659.1, CP014657.1, CP014621.1, CP014620.1, CP014996.1, CP014994.1, CP015024.1,

CP019418.1, CP019417.1, CP019415.1, CP019416.1, CP019414.1, CP019413.1, CP019412.1, CP019411.1, CP019410.1, CP019409.1, CP019408.1, CP019407.1, CP019406.1, CP019404.1, CP019403.1, CP019116.1, CP019181.1, CP008925.1, CP016410.1, CP016408.1, CP013702.1, CP017621.1, CP017617.1, CP007484.1, CP016586.1, CP016581.1, CP016579.1, CP016576.1, CP016573.1, CP016569.1, CP016565.1, CP016563.1, CP016561.1, CP016525.1, CP016530.1, CP016521.1, CP016517.1, CP016514.1, CP016510.1, CP016507.1, CP016504.1, CP011942.1, CP012985.1, CP007468.2.

En el ensayo de inclusividad se realizó con 45 genomas de *S. enterica* subgrupos I, II, IIIa, IIIb IV mediante PCR *in silico*, mostrando la amplificación de una banda característica de 284 pb (Ver Figura 3 y 4) indicativa de amplificación del gen *InvA*, coherente con el tamaño del producto de amplificación esperado (Ver Tabla 2), solo en 42 genomas evaluados y ausencia de amplificación en las dos variantes *Salmonella bongori* incluidas en el estudio y la cepa *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* serovar (Ver Figura 3).

El ensayo de exclusividad desarrollado con los genomas de *Citrobacter Freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* no mostro bandas de amplificación.

Discusión

Las islas de patogenicidad bacterianas contienen un gran número de factores de virulencia, que son esenciales para la supervivencia y patogenicidad de las bacterias. Estos genes esenciales se conservan más evolutivamente que los genes no esenciales en las bacterias. En este estudio, *Salmonellae*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae fue elegida debido a su relevancia en salud pública por su elevada prevalencia en agua y alimentos para el consumo humano. El gen *invA* es un factor potencial de virulencia y está presente en casi todos los serovares y subespecies de *Salmonella*.

Los cebadores calculados y la sonda son muy específicos en relación con sus objetivos respectivos como se confirmó a partir de los resultados BLAST. Se analizaron parámetros como valores E (mínimo), puntuación máxima (máxima) y cobertura de la con-

sulta (máximo) para determinar la especificidad de los oligonucleótidos-primers. Los análisis de BLAST muestran valores E más bajos, esto resulta en más golpes de calidad, debido a que la probabilidad de aciertos no específicos esperados al buscar en una base de datos era baja. Esto también reduce el ruido de fondo aleatorio (BLAST tutoriales y FAQs) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ#expect.

La selectividad de los oligonucleótidos-primers 139-141 utilizados en este trabajo ha sido objeto de estudio en varias investigaciones. La primera de ellas fue realizada por Rahn *et al.* (1992) en el que se amplificó una secuencia de 284 pb dentro del gen *InvA* para la detección de *Salmonella*. Para ello se emplearon 630 cepas de *Salmonella* y 142 géneros de bacterias diferentes a ésta. Todas las cepas evaluadas fueron detectadas, excepto de *S. litchfield* y *S. Senftenberg*, y por el contrario, ninguno de los géneros diferentes a *Salmonella* fue identificado (Rahn *et al.*, 1992). Recientemente se ha comprobado que algunas cepas o variedades serológicas de *Salmonella* no son detectadas por los sistemas de PCR a tiempo real basados en el gen *invA* (figura 1). Entre ellas podemos destacar algunos aislados del serogrupo Saint Paul (el sexto por orden de prevalencia en toxiinfecciones alimentarias en el mundo) o el serogrupo Montevideo. Es posible, dada la naturaleza poco conservada del gen *invA*, que la mayoría de kits comerciales dejen a un lado algunas otras variedades de *Salmonella*, con lo que se añade un factor no deseable de incertidumbre al análisis por PCR que contrarresta sus ventajas. Con el gen *invA* como diana la posibilidad de ofrecer un resultado falso negativo es más alta. Estos resultados son similares a los encontrados en este estudio y en los resultados obtenidos por Orozco-Ugarriza *et al.*, (2016), en el ensayo de selectividad de los oligonucleótidos-primers 139-141.

Dos Santos *et al.*, en el año 2001, ratificaron el empleo de los mismos oligonucleótidos-primers 139-141 para la amplificación del gen *InvA*, al comparar esta técnica con el método microbiológico tradicional. Ellos lograron la detección de *Salmonella*, mediante PCR, luego de la extracción del ADN por la por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y el uso de 1,5 mM de MgCl₂ y una temperatura de hibridación de 54°C, en un total de 96 horas, mientras que en nuestro estudio la detección se hizo en sólo 12 horas.

Conclusiones

Se puede concluir a partir de este estudio que la amplificación *in silico* del gen diana antes de la optimización del ensayo PCR diseñado para la identificación de *Salmonella* spp. puede minimizar el tiempo y el coste necesarios para la verificación *in vitro* del trabajo. Dicho ensayo PCR validado y económicamente viable podría utilizarse para el manejo de la calidad microbiológica del agua y los alimentos de consumo humano o materia prima de productos de consumo.

Bibliografía

- Acosta, L., Pinedo, J., Hernández, E., & Villarreal, J. (2013). Comparación de los métodos de inmunoensayo enzimático automatizado (VIDAS) y PCR para la detección de *Salmonella* spp. en expendios de la ciudad de Santa Marta (Colombia). *Salud Uninorte*, 29(2), 174-182.
- Barros, Y. A., García, L. M., Franco-Anaya, P. A., Abd-El Salam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91-95.
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Chacón, L., Barrantes, K., García, C., & Achí, R. (2010). Artículo original Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30, 18-23.
- Espinal Marin, P., Prieto Suárez, E., Otero Jiménez, V., & Máttar Velilla, S. (2006). Presencia del gen de invasividad *InvA* en cepas de *Salmonella* spp: aisladas de alimentos del Caribe Colombiano. *Revista Cubana de Salud Pública*, 32(2), 115-120.
- Orozco-Ugarriza, M. E., Franco Anaya, P., & Olivo Martínez, Y. (2016). Estandarización de una PCR para la detección del gen *InvA* de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos. *Revista Vitae*. Vol. 23. ISSN 0121-4004 ISSNe 2145-2660.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Barrell, B. G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella* enterica serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), 848-852.
- Pedraza, J. G., Sanandres, N. P., Varela, Z. S., Aguirre, E. H., & Camacho, J. V. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73-94.
- Rahn, K., De Grandis, S., Clarke, R., McEwen, S., Galan, J., Ginocchio, C., Gyles, C. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes*, 6(4), 271-279.
- Dos Santos L, Nascimento V, De Oliveira S, Flores M, Pontes A, Ribeiro A, et al. (2001). Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(5), 247-250.
- Su, L., & Chiu, C. (2007). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 30(3), 210.
- Terrier, B., & Martínez, V. (2006). Salmonelosis. EMC-Tratado de Medicina, 10(4), 1-6.
- Tindall, B., Grimont, P., Garrity, G., & Euzéby, J. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 521-524.
- Torrens, H. R., Argilagos, G. B., Cabrera, M. S., Valdés, J. B., Sáez, S. M., & Viera, G. G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(8), 1-27.
- Uribe, C., & Suárez, M. C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia médica*, 37(2), 151-158.
- Varela, Z. S., Lavallo, L. P., & Alvarado, D. E. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.