

DETECCIÓN DE *Plesiomonas shigelloides* MEDIANTE LA PCR EN TILAPIAS SILVESTRES (*Oreochromis mossambicus*) Y CULTIVADAS (TETRAHÍBRIDO *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) EN VENEZUELA

Detection of *Plesiomonas shigelloides* by PCR in feral (*Oreochromis mossambicus*) and cultured tilapias (Tetrahybrid of *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) in Venezuela

Marianella Moreno¹, Lourdes Yelitza Medina¹, Julia Dolores Álvarez Rivera¹, José M. Obregón² y Gladys Medina³

¹Laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos. ²Laboratorio de Enfermedades Vesiculares. ³Laboratorio de Arbovirus. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay, Venezuela. Correo: jdarivera@cantv.net

RESUMEN

Plesiomonas shigelloides es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. No forma parte de la flora normal del humano, mientras que los peces dulceacuícolas como las tilapias se tienen como su reservorio primario. Considerando: a) La implicación cada vez más frecuente de este microorganismo como agente causal de enfermedades intra y extra intestinales, b) El incremento de la comercialización de tilapias silvestres y de cultivo a nivel nacional y c) La necesidad de métodos de detección e identificación rápidos y efectivos de patógenos, se aplicó el método biomolecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se procesaron mediante la PCR, cepas de *P. shigelloides* y homogeneizados de pools de bazo, riñón y cerebro, y de intestino de tilapias, utilizándose oligonucleótidos iniciadores específicos para el gen 23S ARNr de *P. shigelloides*. Se obtuvo el reconocimiento del 75% de las 20 cepas identificadas por pruebas fenotípicas convencionales, detectándose además en 27% de los homogeneizados frescos y en 18% de los congelados. Estos resultados confirman la especificidad del método para la identificación de diversas bacterias potencialmente patógenas, su utilidad en el mejoramiento del sistema de control de calidad de granjas dulceacuícolas y en el estudio de casos clínicos, aumentando la efectividad del sistema de salud relacionado con estas áreas.

Palabras clave: Tilapias, identificación, *Plesiomonas shigelloides*, PCR.

ABSTRACT

Plesiomonas shigelloides is a Gram negative rod, facultative anaerobic, motile, that belongs to the Enterobacteriaceae. It's not part of the normal human flora, while fresh water fish like tilapias are thought to be its primary reservoir. Considering: a) The more frequent implication of this microorganism as the causal agent of intra and extraintestinal infections, b) The wide spread of national commercialization of feral and cultured tilapias and c) The need for rapid and effective detection and identification methods, the biomolecular technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied. Strains of *P. shigelloides* and pools of homogenates from spleen, kidney and brain and the intestine of tilapias were processed by PCR, using specific primers for the gene 23S rRNA of *P. shigelloides*. The 20 strains identified by conventional phenotypic traits were identified in 75%, additionally it was detected in 27% of the fresh homogenates and in 18% of the frozen ones. These results confirm the specificity of the technique for the identification of a diverse range of potential pathogenic bacteria, its usefulness in the improvement of quality control in freshwater farms and in the study of clinical cases, improving the effectiveness of health systems related with these areas.

Key words: Tilapias, identification, *Plesiomonas shigelloides*, PCR.

INTRODUCCIÓN

El Lago de Valencia es un cuerpo de agua aislado, ubicado en la región centro norte de Venezuela, y en el cual la

comercialización de sus productos representa una importante fuente de ingresos a pesar del problema de contaminación que presenta. Su cuenca comprende tierras agropecuarias, residenciales e industriales, donde se asientan centros urbanos importantes y se desarrollan actividades económicas de gran crecimiento, tales como industrias, servicios y agricultura [21]. Estas actividades representan una fuente permanente de contaminación del lago, al verter en él grandes volúmenes de aguas servidas que aceleran su degradación [6].

En este lago, la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) es la especie íctica más apreciada por los pescadores, existiendo un comercio clandestino rentable con respecto a su venta en forma de filetes, distribuidos éstos en diferentes ciudades del país. Un 95% de los pescadores de la cuenca extraen la tilapia para fines comerciales y consumo directo [6]. En cuanto a la producción comercial, cabe destacar que el cultivo de la tilapia roja (tetrahíbrido de *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) constituye una importante actividad dentro de la acuicultura nacional debido, entre otros, a su alta tasa de reproducción en granjas acuícolas [1].

Las tilapias son susceptibles a infecciones de etiologías diversas, entre las que destacan las diferentes especies de bacterias consideradas como patógenos facultativos u oportunistas, ya que son componentes normales de la flora de los peces y de su ambiente acuático [10, 14, 22]. Se ha demostrado experimentalmente que *Plesiomonas shigelloides* es una de las especies que está presente en forma abundante en las tilapias del Lago de Valencia y en el agua y sedimento de su entorno, observándose la misma tendencia en la microflora de tilapias cultivadas y en su medio ambiente [2].

Recientes análisis filogenéticos y perfiles antigénicos indican que existe una relación estrecha entre *P. shigelloides* y miembros de la familia Enterobacteriaceae, familia en la cual ha sido ubicada taxonómicamente desde el año 2001 [8, 11, 13]. *P. shigelloides* es la única especie del género, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por presencia de flagelos polares, que no forma parte de la flora normal de los humanos [11, 13]. Este patógeno ha sido aislado de heces de pacientes con gastroenteritis relacionadas con el consumo de ostras y pescado crudo o mal cocido, y ha sido asociado a diarreas espontáneas e infecciones extra intestinales de elevada mortalidad, tales como septicemias y meningitis del recién nacido [20]. Aún no han sido totalmente esclarecidos sus mecanismos de patogenia, atribuyéndosele en parte a la invasividad, enterotoxigenicidad y asociación a plásmidos [9].

Debido a la implicación de *P. shigelloides* como agente causal de enfermedades tanto en peces como en humanos [4, 12], es importante contar con métodos de identificación rápidos y efectivos, que puedan superar en especificidad y sensibilidad a los métodos de diagnóstico convencionales, permitiendo mejorar el control sanitario requerido para la comerciali-

zación de productos de consumo humano [19]. En respuesta a esta necesidad, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: "Polymerase Chain Reaction"), ha surgido como una opción confiable en la detección de diferentes bacterias patógenas, sin que ello implique un desplazamiento absoluto de los métodos de detección convencionales [16].

La técnica de la PCR implica un proceso extremadamente sensible; ésta requiere muy poca cantidad de muestra, permitiendo amplificar y analizar el ADN contenido en muestras tan variadas como células únicas, folículos pilosos y sedimentos orgánicos, entre otros. La técnica de la PCR se usa también para detectar agentes infecciosos, en especial bacterias y virus latentes [18].

Considerando: a) La implicación cada vez más frecuente de este microorganismo como agente causal de enfermedades intra y extra intestinales, b) El incremento de la comercialización de tilapias silvestres y de cultivo a nivel nacional y c) La necesidad de métodos de detección e identificación rápidos y efectivos de patógenos, se aplicó el método biomolecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación y detección de cepas de *P. shigelloides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de la PCR se aplicó a 4 tipos de muestras:

- Grupo A: Conformado por las cepas de colección de *P. shigelloides* del laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos [2], descritas en la TABLA I.
- Grupo B: Sobrenadante y precipitado de homogeneizado fresco del bazo, riñón, cerebro (BRC) y del intestino de tilapias de Mozambique silvestres.
- Grupo C: Sobrenadante y precipitado de homogeneizado congelado (a -20°C) del bazo, riñón y cerebro, y del intestino de tilapias rojas cultivadas en el Edo. Falcón, a partir de los cuales fueron aisladas cepas de *P. shigelloides*. Estas muestras fueron rápidamente descongeladas previo a su utilización para la extracción del ADN a temperatura ambiente.
- Grupo D: Cepas utilizadas como control negativo, tomadas de la Colección del Banco de Bacterias del laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos del INIA-CE-NIAP, conformadas por las especies:
 - 72E 1°AQUA01 *Escherichia coli*;
 - 4 Sal 1°AQUA99 *Klebsiella pneumoniae*;
 - 112E 1°TILAPIA98 *Aeromonas hydrophila*;
 - 114E 1°AQUA02 *Escherichia coli*.

TABLA I

CEPAS DE COLECCIÓN DE *Plesiomonas shigelloides* (GRUPO A) / COLLECTION OF *Plesiomonas shigelloides* STRAINS (GROUP A)

Cepa Cod. Interno N°	Procedencia	Cepa Cod. Interno N°	Procedencia
*70 1°LV99	Silvestre	57 1°AQUA99	Cultivo
53 1°LV99	Cultivo	64 1°AQUA99	Cultivo
3 1°AQUA99	Cultivo	68 1°AQUA99	Cultivo
5 1°AQUA99	Cultivo	96 1°AQUA99	Cultivo
16 1°AQUA99	Cultivo	19P 1°AQUA01	Cultivo
19 1°AQUA99	Cultivo	25P 1°AQUA01	Cultivo
23 1°AQUA99	Cultivo	147 1°LV00	Silvestre
34 1°AQUA99	Cultivo	1P 1°AQUA01	Cultivo
40 1°AQUA99	Cultivo	6P 1°AQUA01	Cultivo
55 1°AQUA99	Cultivo	7P 1°AQUA01	Cultivo

Cod.= Código. *=Cepa control positivo.

Preparación de homogeneizados de tejido

A partir de una muestra de 20 tilapias de Mozambique se formaron grupos de cinco ejemplares para la preparación de los pools. Previa desinfección del área con alcohol, se realizó la necropsia siguiendo la técnica indicada por Amlacher [3]. Una vez expuestos los órganos internos, se procedió a tomar muestras de éstos para la preparación de dos tipos de pools: uno de BRC, y otro de intestino. Se maceraron en condiciones asépticas los pools antes mencionados, tanto de origen fresco como congelado, éstos fueron mezclados con PBS (buffer fosfatado) estéril pH 7,4 en una proporción 1:5. Estas mezclas se centrifugaron a 3500 rpm a 4°C. Luego de centrifugadas las muestras se almacenaron por separado el sobrenadante y el precipitado, para la extracción del ADN.

Colonias puras de cepas de *P. shigelloides*

A partir de los macerados se inocularon mediante siembra directa muestras de los pools en el medio Inositol Bilis Verde Brillante (IBB), medio selectivo y diferencial para *P. shigelloides* [11, 13]. Del aislamiento primario se escogieron las colonias sospechosas de acuerdo a sus características morfológicas (colonias con tonalidad rosada luego de 48 horas de incubación a 30°C), las cuales fueron purificadas mediante un pase en agar tripticasa soya. Luego se les repitieron las pruebas fenotípicas efectuadas por Álvarez y Agurto [2] siguiendo los esquemas de identificación de Koneman y col. [15] y Austin y Lee [5], que llevaron a la identificación y confirmación de la identificación de las cepas aisladas, de las muestras provenientes del Grupo B y Grupo A, respectivamente. De cada cepa una colonia pura fue transferida a 10 mL de caldo tripticasa soya (CTS) e incubada luego por 18 horas a 35°C. Se utilizó 1,5 mL de este cultivo para la extracción del ADN.

Extracción del ADN

Basados en el protocolo de González-Rey y cols. [12], el ADN genómico se extrajo de cultivos en fase logarítmica por solubilidad en fases inmiscibles por el método CTAB/fenol-cloroformo (CTAB: por sus siglas en inglés "Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide" SIGMA®). El desarrollo bacteriano en CTS y los homogeneizados de tejido fueron centrifugados a 16.000 × g por 5 minutos a 4°C, luego se resuspendió el precipitado de cada uno en 570 µL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8,0), 30 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio SIGMA®) al 10%, y 3 µL de proteinasa K (20 mg/mL SIGMA®), y se incubó durante 90 minutos a 40-42°C. Posteriormente se añadieron 100 µL de NaCl 5 M y 80 µL de CTAB/NaCl [10% CTAB en 0,7 M de NaCl (SIGMA®)], y se incubó por 15 minutos a 65°C. Se agregó 0,8 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1; SIGMA®) y se centrifugó a 16.000 × g por 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; SIGMA®), luego se centrifugó a 16.000 × g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf y se agregó 400 µL de propanol frío (-20°C), para luego centrifugar a 16.000 × g por 5 minutos a 4°C. El ADN precipitado se lavó con 500 µL de etanol frío (4°C) y se centrifugó por 10 minutos, para finalmente resuspenderlo en 100 µL de agua destilada estéril, conservándose la muestra a -20°C según el tiempo requerido.

Para llevarse a cabo el proceso de amplificación, se verificó que el ADN extraído tuviese una concentración igual o mayor a 10 ng/µL y un índice de absorbancia (260/280) entre 1,5 y 2,0 [12, 17].

Aplicación de la PCR

Oligonucleótidos iniciadores utilizados: Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores fueron tomadas de

González-Rey y cols. [11]: sentido (PS23FW3) 5'-CTC CGA ATA CCG TAG AGT GCT ATC C-3', y antisentido (PS23RV3) 5'-CTC CCC TAG CCC AAT AAC ACC TAA A-3'. Estos oligonucleótidos amplifican la región específica comprendida entre los nucleótidos C-906 y G-1189 del gen 23S ARNr de *P. shigelloides*.

Amplificación del ADN: El volumen final de la reacción se ajustó a 50 µL, mezclando 5 µL de TE buffer PCR 10X (Promega), 0,8 µL de una solución 25mM de dNTPs (SIGMA®), 8,5 µL de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores, 5 µL de ADN muestra (10 ng/µL) ó 10 µL de amplicones en caso de aplicarse un segundo proceso de amplificación, 2 U de Taq ADN Polimerasa (5 U/µL, Promega), 5 µL de MgCl₂ 25 mM (SIGMA®), completándose el volumen final de reacción a 50 µL con agua libre de nucleasas (SIGMA®).

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Amplifitron® II Thermolyne Barnstead Internacional, E.U.A.) con los siguientes parámetros cíclicos de temperatura: 1 ciclo a 4°C por 5 minutos y otro de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos: de 94°C por 1 minuto (desnaturalización), 68°C por 1 minuto (alineación) y 72°C por 1 minuto (extensión), y un paso de extensión final de 72°C por 10 minutos.

Detección del ADN amplificado: Todos los ADN amplificados se separaron a un voltaje constante de 140 vatios en geles de agarosa (SIGMA®) al 1,5% en 1X TAE amortiguador. Los ADN fueron visualizados al ser teñidos con bromuro de etidio (1 µg/µL SIGMA®), y se observaron en un transiluminador de LUV (TFP-M/WL Vilber Lourmat, Francia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los homogeneizados mantenidos a -20°C se detectaron 6 cepas de *P. shigelloides*, mientras que de los homogeneizados frescos se reconocieron 9 cepas. En ambos tipos de homogeneizados, se evidenció la presencia de la bacteria tanto en el intestino como en el pool de BRC, mediante pruebas fenotípicas convencionales [2].

La extracción de ADN a partir de las cepas aisladas de tilapias silvestres y de cultivo, caracterizadas fenotípicamente

como *P. shigelloides* (cepas de colección), arrojó rangos de concentración entre 50 y 110 ng/µL y de índice de presunción de pureza entre 1,6 y 1,9.

Se sometieron al proceso de extracción del ADN tanto los sobrenadantes como los precipitados de los homogeneizados de BRC, y de intestino, mantenidos a -20°C y en fresco, obteniéndose los siguientes resultados:

Al procesar 16 muestras de homogeneizados frescos sólo 11 (68,75%) cumplieron con los requerimientos de la técnica de la PCR: rangos de 100 a 1.000 ng/µL de concentración de ADN y una pureza entre 1,8 y 2,0. En cuanto a los homogeneizados mantenidos a -20°C, sólo 18 (75%) dieron resultados acordes a los requerimientos para la aplicación de la técnica de la PCR: rangos de 50 a 500 ng/µL y pureza entre 1,5 y 1,8 (TABLA II).

Se observa que las concentraciones e índices de pureza promedio obtenidos de homogeneizados de BRC son mayores que los de intestino. El porcentaje promedio de extracción del ADN fue mayor en los precipitados que en los sobrenadantes. Los tejidos que conforman al bazo, riñón y cerebro en individuos aparentemente sanos, poseen una diversidad y densidad bacteriana mucho menor que el intestino, además de que son más fáciles de escindir que el de intestino, lo que puede ser la causa de que las concentraciones de ADN de *P. shigelloides* a partir de homogeneizados de BRC, sean considerablemente más altas que las de intestino.

Al aplicarse la metodología de la PCR a las 20 cepas de colección tipificadas, fenotípicamente como *P. shigelloides* se obtuvo un reconocimiento de 15 de ellas (75%), y ningún reconocimiento al aplicarla sobre las tres cepas consideradas grupo control negativo (TABLA III). Estos resultados demuestran la especificidad de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la mayoría de las cepas identificadas, concordando así con los resultados obtenidos por González-Rey y col. [12], quienes detectaron *P. shigelloides* a partir de diversas muestras, utilizando para ello la secuencia de iniciadores sobre la cual se basó este trabajo de investigación (TABLA IV).

Sería interesante aplicar otro tipo de pruebas para corroborar la identificación fenotípica de las 5 cepas de *P. shigelloi-*

TABLA II
RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN DE HOMOGENEIZADOS DE TEJIDOS / RESULTS OF THE EXTRACCIÓN OF DNA FROM TISSUE HOMOGENATES

	Mantenidos a -20°C				Frescos			
	B.R.C.		Intestino		B.R.C.		Intestino	
	Sobre.	Precip.	Sobre.	Precip.	Sobre.	Precip.	Sobre.	Precip.
Concentrado (ng/µL)	22,03	181,38	20,48	46,87	20,87	672,28	0	221,98
I. Abs	1,52	1,36	1,41	1,23	2,12	1,88	0	2,04
Extracción	66,6%	100%	83,3%	100%	75%	100%	0%	100%

Homog= Homogeneizados. Promed.= Promedio. Conc.= Concentración. Sobre.= Sobrenadantes. I. Abs.= Índice de Absorbancia. Precip.= Precipitado.

TABLA III
APLICACIÓN DE LA PCR A LAS CEPAS DEL GRUPO D /
PCR APPLICATION TO GROUP D STRAINS

Cepa	Detección por PCR
<i>Escherichia coli</i>	No
<i>Aeromonas hydrophila</i>	No
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No

des que no fueron reconocidas por estos oligonucleótidos iniciadores, tales como, electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), entre otros.

De la aplicación de la técnica de la PCR sobre un total de 8 homogeneizados frescos (TABLA V) de vísceras de tilapias se obtuvo reconocimiento de *P. shigelloides* sólo en 3 de éstos. Este bajo porcentaje de reconocimiento pudo deberse a que la técnica aplicada requiere una concentración óptima aproximada de 10 ng/μL de ADN puro del microorganismo a detectar, dificultándose obtener esta concentración a partir de un tejido considerado reservorio de muchas especies bacterianas, incluso luego de una segunda aplicación de la técnica de la PCR.

Con la aplicación de una segunda amplificación se logra maximizar la sensibilidad de la PCR, ya que aumenta la concentración del ADN a detectar, obteniéndose resultados favorables en la identificación conjunta de diversas especies bacterianas [7], por lo que se decidió implementarla en esta investigación en vista de la diversidad de bacterias que se encuentran implícitas como flora normal de los peces.

Por otra parte, con el procesamiento de 5 sobrenadantes y 5 precipitados de homogeneizados de vísceras que habían sido mantenidos congelados (TABLA VI) —luego de la aplicación de una segunda amplificación—, se reconoció la presencia de *P. shigelloides* en un sobrenadante y un precipitado de homogeneizado de BRC y en un precipitado de intestino (20%).

También es de hacer notar, que la literatura señala que los oligonucleótidos iniciadores utilizados aquí son específicos para *P. shigelloides* [12], sin embargo, no se conoce su especificidad para los distintos serotipos que puedan existir en Venezuela.

Cabe resaltar la detección de *P. shigelloides* en un precipitado de intestino a partir del cual no hubo aislamiento previo de la bacteria, lo que indica que el método es en extremo sensible ya que no requiere grandes cantidades del ADN a pesquisar, y brinda rapidez en la detección, en comparación con el aislamiento en medios de cultivo que requiere de estrictas condiciones de crecimiento, así como de la viabilidad de la bacteria para que se multiplique, y del reconocimiento de la colonia para que no pase desapercibida en un medio que contenga colonias de morfología muy similar.

La aplicación de la técnica de la PCR brinda confiabilidad y rapidez en la detección de microorganismos bacterianos, sin embargo, la aplicación de ésta directamente en homogeneizados requiere un buen proceso de maceración para facilitar su utilización y optimizar los resultados, sea a partir del sobrenadante o precipitado.

TABLA IV
APLICACIÓN DE LA PCR A LAS CEPAS DE COLECCIÓN / PCR APPLICATION TO THE Collection STRAINS

Cepa	Detección por la PCR	Cepa	Detección por la PCR	Cepa	Detección por PCR	Cepa	Detección por la PCR
70	No	19	Sí	57	Sí	25P	Sí
35	Sí	23	Sí	64	Sí	147	Sí
3	Sí	34	No	68	Sí	1P	No
5	Sí	40	Sí	96	Sí	6P	No
16	Sí	55	Sí	19P	Sí	7P	No

TABLA V
APLICACIÓN DE LA PCR A HOMOGENEIZADOS FRESCOS DE TEJIDOS / PCR APPLICATION TO FRESH TISSUE HOMOGENATES

B.R.C.				Intestino			
Pool	Desarrollo en IBB	Detección por la PCR		Pool	Desarrollo en IBB	Detección por la PCR	
		Sob.	Prec.			Sob.	Prec.
1	Sí	No	No	1	Sí	X	Sí
2	No	No	No	2	Sí	X	Sí
3	Sí	X	No	3	No	X	No
4	Sí	No	No	4	Sí	X	Sí

Sob.= Sobrenadante. Prec.= Precipitado. X= No se obtuvo extracción óptima de ADN.

TABLA VI
**APLICACIÓN DE LA PCR EN HOMOGENEIZADOS DE TEJIDOS MANTENIDOS A -20°C / PCR APPLICATION TO TISSUE
HOMOGENATES MAINTAINED AT -20°C**

B.R.C.				Intestino			
Pool	Desarrollo en IBB	Detección por la PCR		Pool	Desarrollo en IBB	Detección por la PCR	
		Sob.	Prec.			Sob.	Prec.
1	Sí	No	Sí	1	Sí	No	No
2	No	X	No	2	No	X	No
3	Sí	No	No	3	No	X	No
4	Sí	No	No	4	No	X	No
5	Sí	Sí	No	5	No	X	No
6	No	X	No	6	No	X	Sí

Sob.= Sobrenadante. Prec.= Precipitado. X = No se obtuvo extracción óptima de ADN.

Como resultado de la aplicación de la PCR a las muestras seleccionadas se obtuvo una banda definida de aproximadamente 284 bp, correspondiente al gen 23S ARNr determinado para *P. shigelloides*, coincidiendo con lo reportado por González-Rey [12] (FIG. 1).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es importante proseguir con la evaluación de los oligonucleótidos iniciadores, así como, con la cuantificación de la sensibilidad práctica de la técnica al utilizar dichos oligonucleótidos en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas en Venezuela.

Es imprescindible obtener una extracción óptima del ácido nucleico de la muestra para tener resultados confiables en la aplicación de la técnica de la PCR, siendo la cuantificación del índice de absorbancia un buen método de presunción de pureza.

La aplicación de la técnica de la PCR brinda rapidez en la detección de *P. shigelloides*, sin embargo, su utilización directa en homogeneizados requiere un buen proceso de maceración para optimizar los resultados.

El aplicar una segunda amplificación en los homogeneizados optimiza la detección del microorganismo, ya que se cuenta con mayor cantidad de ADN blanco para emplear nuevamente la técnica.

Si se utiliza la técnica de la PCR a partir de las cepas bacterianas aisladas en medios diferenciales y selectivos, se optimizará la detección bacteriana, sobre todo en brotes de enfermedades –bien sea en humanos o animales– donde se requiera un diagnóstico rápido y confiable, en cuyo caso se obtendrían resultados en un período de alrededor de 48 horas.

Los resultados obtenidos a partir del procesamiento de muestras congeladas y frescas, indican diferencias que pue-

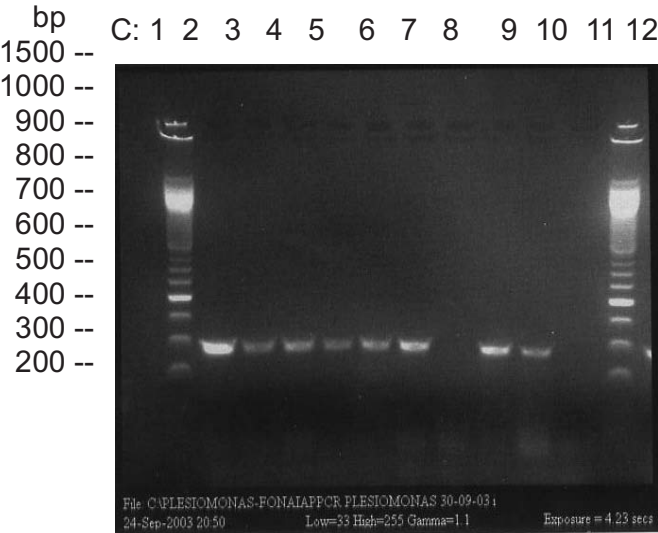


FIGURA 1. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA PCR: SE OBSERVAN BANDAS DE 284 BP EN LOS CARRILES 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 Y 10, CORRESPONDIENTES A *P. shigelloides*. CARRILES 8 Y 11 POSEEN LAS CEPAS CONTROL NEGATIVO / RESULTS OF THE APPLICATION OF PCR: BANDS OF 284 BP ARE OBSERVED IN LINES 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 AND 10, CORRESPONDING TO *P. shigelloides*. LANES 8 AND 11 HAVE NEGATIVE CONTROL.

den relacionarse con el efecto de la temperatura y/o del tiempo de almacenamiento, sobre la integridad del ADN bacteriano.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y al Fondo Nacional de Ciencia Innovación y Tecnología (FONACIT) por el financiamiento de este Trabajo de Investigación a través de los Proyectos N° 02-613-04001 y Agenda N° 2000001218, respectivamente, que hicieron posible este Trabajo de Investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALCESTE, C.; JORY, D.E. Best tilapia strains. **Aquaculture Magazine**. March/April. 80-84 pp. 2000.
- [2] ÁLVAREZ, J.; AGURTO, C. Bacterioflora Gram negativa de tilapias silvestres y cultivadas en la Región Central de Venezuela durante el período 1999-2000. **Vet. Trop.** 25 (2): 209-228. 2000.
- [3] AMLACHER, E. **Textbook of Fish Diseases**. T.F.H. Publications Inc. Jersey City, USA. 302 pp. 1970.
- [4] AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial Fish Pathogens – Disease in Farm and Wild Fish**. 2nd. Ed. Ellis Horwood Ltd. Chichester, England, U.K. 317 pp 1993.
- [5] AUSTIN, B.; LEE, J.V. Aeromonadaceae and Vibrionaceae. Identification methods in applied and environmental microbiology. **Technical Series of the Society for Applied Bacteriology**. 163-182 pp. 1992.
- [6] BISBAL, F. Consumo de la Fauna en el Lago de Valencia, Estados Aragua y Carabobo, Venezuela. **Bol. del Centro de Investig. Biol.** 34(3): 362-375. 2000.
- [7] BRASHER, C. W.; DE PAOLA, A.; JONES, D.; BEJ, A. Detection of Microbial Pathogens in Shellfish with Multiplex PCR. **Current Microbiol.** 3: 101-107. 1997.
- [8] BRAVO, L.; CABRERA, R.; RAMÍREZ, M.; LLOP, A.; FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA, B.; MORIER, L. *Plesiomonas shigelloides*, una Vibrionaceae en quien pensar. **Rev. Cub. de Med. Trop.** 52(1): 10-14. 2000.
- [9] BRAVO, L.; DE PAULA, O.; MAESTRE, J.; RAMÍREZ, M.; GARCÍA, B. Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en *Plesiomonas shigelloides*. **Rev. Cub. de Med. Trop.** 50(3): 203-206. 1998.
- [10] CONROY, G.; CONROY, D. Enfermedades y parásitos de cachamas, pacus y tilapias. Pharma Fish S.R.L. Maracay: **Documento técnico**(3). 30 pp. 1998.
- [11] GONZÁLEZ-REY, C. "Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments". Swedish University of Agricultural Sciences. (Tesis de Doctorado). 40 pp. 2003.
- [12] GONZÁLEZ-REY, C.; SVENSON, S.; BRAVO, L.; ROSINSKY, J.; CIZNAR, I.; KROVACEK, K. Specific detection of *Plesiomonas shigelloides* isolated from aquatic environments, animals, and human diarrhoeal cases by PCR based on 23S rRNA gene. **FEMS Immunol. and Med. Microbiol.** 29: 107-113. 2000.
- [13] HERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZ, R. Prevalencia de *Plesiomonas shigelloides* en agua de superficie. **Archiv Latin. de Nutr.** 4(1): 47-49. 1997.
- [14] ISLAM, S.; ALAN, J.; ISLAM, S. Distribution de *Plesiomonas shigelloides* in Various Components of Pond Ecosystem in Dhaka, Bangladesh. **Microbiol. Immunol.** 35(11): 927-932. 1991.
- [15] KONEMAN, E.; ALLEN, S.; WILLIAM, J.; SHECKENBERGER, P.; WINN, W. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5th, Ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lipincott. 212-218 pp. 1997.
- [16] LUQUE, J.; HERRÁEZ, A. **Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud**. Madrid: Harcourt S.A. 119-195 pp. 2001.
- [17] MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruent with results of DNA-DNA hybridizations. **Internat. J. System. Bacteriol.** 42: 412-421. 1992.
- [18] MAS, E.; POZA, J.; CIRIZA, J.; ZARAGOZA, P.; OSTA, R.; RODELLAR, C. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC*, (15). <http://aquatic.unizar.es/n3/art1501/basespcr.htm>. 2001.
- [19] MEDINA, L.; MORENO, M. Aplicación de protocolos de biología molecular en la identificación y detección de *Plesiomonas shigelloides* provenientes de tilapias silvestres del Lago de Valencia y de cultivo de una granja comercial de Venezuela. Trabajo de Investigación de 5to. Año. Universidad de Carabobo. 53 pp. 2003.
- [20] MENDOZA, C.; HERNÁNDEZ, P. Incidencia de *Plesiomonas shigelloides* en tetratíbridos de tilapias (*Oreochromis* sp.). **Archiv. Latin. de Nutr.** 49(1): 67-71. 1999.
- [21] MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES (MARN). **Estudio Integral de los Tributarios de la Cuenca del Lago de Valencia**. Caracas. 3-7 pp.2000.
- [22] PAPERNA, I. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. **An update**. FAO. Roma, **CIFA Technical Paper 31**. Italia. 220 pp. 1996.