



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**COMPARACIÓN DE PCR DE TIEMPO REAL Y EL CULTIVO BACTERIOLÓGICO, EN
LA DETECCIÓN DE *Salmonella typhimurium* DESDE POLLOS.**

CRISTIÁN LÓPEZ HENRÍQUEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: DR. JOSÉ PIZARRO LUCERO

**SANTIAGO, CHILE
2004**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE PCR DE TIEMPO REAL Y EL CULTIVO BACTERIOLÓGICO, EN LA DETECCIÓN DE *Salmonella typhimurium* DESDE POLLOS.

CRISTIÁN LÓPEZ HENRÍQUEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

Nota Final:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA: DR. JOSÉ PIZARRO LUCERO
PROFESOR CONSEJERO: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: DR. MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

SANTIAGO, CHILE
2004

Esta tesis fue financiada parcialmente por Laboratorio Roche Chile S. A.

III. RESUMEN

Salmonella spp. es uno de los principales agentes bacterianos responsables de toxiinfecciones alimentarias, siendo los diferentes productos de la industria avícola la mayor fuente de infección para el hombre. Esto hace necesario un constante monitoreo de *Salmonella* en los productos avícolas, para evitar brotes de Salmonelosis en la población.

El aislamiento de *Salmonella* mediante el cultivo bacteriológico estándar implica como mínimo 4 a 7 días, después de procesos de pre-enriquecimiento y enriquecimientos en las etapas preliminares, antes de su identificación con pruebas bioquímicas y serológicas.

Para reducir los tiempos y costos que involucra la utilización del cultivo bacteriológico estándar, se han desarrollado técnicas rápidas de detección de *Salmonella spp.* El Lightcycler PCR (Roche) de tiempo real permite reducir los tiempos de detección, procesar hasta 32 muestras simultáneamente y realizar el diagnóstico con una alta especificidad y sensibilidad.

El objetivo de este trabajo fue comparar el PCR de tiempo real con detección por sondas fluorescentes, mediante la utilización de un kit diagnóstico comercial diseñado originalmente para muestras de alimentos, con el cultivo bacteriológico estándar, para la detección de *Salmonella typhimurium* en los dos tipos de muestras que oficialmente son remitidas, directamente desde las plantas faenadoras, al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura.

Las muestras de piel de cuello y agua de lavado de canales de pollos fueron inoculadas experimentalmente con 10^4 ufc/ml de *S. typhimurium nal^r rif^r*. De las 132 muestras de piel de cuello de pollo analizadas por PCR tiempo real, 46 muestras (34,8%) fueron positivas y 86 muestras (65,2%) fueron negativas. De las 132 muestras de agua de lavado de canales de pollo analizadas por PCR tiempo real, 116 muestras (87,9%) fueron

positivas y 16 muestras (12,1%) fueron negativas. Todas las muestras analizadas por cultivo bacteriológico estándar fueron positivas.

Basado en estos resultados, se puede afirmar que existen diferencias significativas en la detección de *Salmonella spp.* entre el cultivo bacteriológico estándar y el PCR tiempo real realizado con un kit diagnóstico comercial originalmente diseñado para muestras de alimentos, por lo que el ensayo diagnóstico más apropiado para la detección de *Salmonella spp.* desde piel de cuello y agua de lavado de canales de pollos es el cultivo bacteriológico estándar.

IV. SUMMARY

Salmonella spp. is one of the major bacterial agents responsible of food-borne poisoning, being poultry products the main source of infections for humans. This makes necessary a constant control of *Salmonella* in the poultry products, in order to avoid outbreaks of Salmonellosis.

Standard bacteriological culture used for the isolation of *Salmonella* takes at least 4 to 7 days, after pre-enrichment and enrichment in the preliminary stages, before the identification by biochemical and serological tests.

Rapid detection techniques have been developed to reduce times and costs that involve the use of standard bacteriological culture to isolate *Salmonella spp.* The Lightcycler (Roche) real time PCR reduces the detection times, the process of up to 32 samples simultaneously, and allows the detection of the amplified product with high specificity and sensitivity.

The objective of this work was to compare the real time PCR with hibridization probes, by using a commercial diagnostic kit originally designed for food samples, with the standard bacteriological culture, for detection of *Salmonella typhimurium* in two samples officially sent it directly from the slaughterhouses to the Agricultural and Livestock Services (SAG), of Agriculture Ministries.

Chicken neck skin and rinse water of carcass were experimentally inoculated with 10^4 cfu/ml of *S. typhimurium nal^r rif^r*. From the 132 chicken neck skin samples analyzed by real time PCR, 46 samples (34,8%) were positive and 86 samples (65,2%) were negative. From the 132 rinse water of carcass samples analyzed by real time PCR, 116 samples (87,9%) were positive and 16 samples (12,1%) were negative. All samples analyzed by standard bacteriological culture were positive.

Based in this results, it can be concluded that exist significant differences on the detection of *Salmonella spp.* among standard bacteriological culture and real time PCR carried out with a commercial diagnostic kit originally designed for food samples, so the standard bacteriological culture is the most appropriated diagnostic test for detection of *Salmonella spp.* in chicken neck skin and rinse water of carcass.

1. INTRODUCCIÓN.

Los alimentos pueden causar enfermedades en el hombre y en los animales si es que éstos contienen patógenos tales como bacterias, virus, hongos o parásitos.

Entre las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos, la Salmonelosis es una de las más comunes en el mundo, tanto en humanos como en animales.

Una de las industrias más afectadas por *Salmonella* es la industria avícola, ya que los productos derivados de su explotación, ya sea carne, huevos o subproductos, pueden resultar contaminados con *Salmonella*, con el potencial riesgo que ésto pueda ocasionar en la población humana.

Por tal motivo, la industria avícola busca rutinariamente *Salmonella* en los distintos productos que produce, como una forma de controlar y conocer el grado de contaminación de sus productos. El método diagnóstico ideal a usar debiera permitir su aplicación a un gran número y tipos de muestras, a un bajo costo, con una alta especificidad y sensibilidad, y con una entrega de resultados rápida y de fácil interpretación. Sin embargo, el diagnóstico tradicional de *Salmonella* mediante aislamiento bacteriológico y confirmación serológica, demanda aproximadamente 4 a 7 días para tener el resultado del ensayo, por lo que se hace necesario buscar un método diagnóstico más apropiado a los requerimientos de la industria avícola.

Recientemente se ha aplicado la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de *Salmonella* en muestras de piel de pollo, tómulas cloacales, heces, harina de pluma hidrolizada, harina de carne, paja y vísceras. Dentro de las variantes de PCR existentes, el PCR de tiempo real es el

que representa la alternativa más promisorio para una detección más eficiente de *Salmonella* en muestras de la industria avícola, ya que permite un diagnóstico rápido y altamente específico de las muestras.

El propósito final de este trabajo es comparar el PCR de tiempo real, realizado con un kit diagnóstico comercial originalmente diseñado para muestras de alimentos, con el cultivo bacteriológico estándar, para la detección de *Salmonella typhimurium* en piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo, inoculadas experimentalmente.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Los cambios en los estilos de vida, y las distintas prácticas de alimentación, preparación y almacenamiento de los productos alimenticios están obligando a las autoridades a asumir posiciones más rigurosas en cuanto al control de la calidad e inocuidad de los alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), son causadas por el consumo de alimento o agua contaminada con agentes biológicos, químicos y físicos. En la actualidad se han descrito más de 250 enfermedades diferentes por consumo de alimento contaminado, muchas de ellas causadas por un agente infeccioso, ya sea virus, bacterias, hongos o parásitos, pero también algunas producidas por la contaminación directa con elementos tóxicos. Sin embargo, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes se deben al consumo de alimentos contaminados con microorganismos bacterianos (CDC, 2002a).

En Estados Unidos de Norteamérica (E.E.U.U) se estiman en 76 millones los casos anuales de ETAs en la población humana de ese país, con unas 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes, lo cual representa costos significativos dentro de los gastos de salud (Mead *et al.*, 1999). Entre los años 1996-2002, en E.E.U.U, se produjo una disminución sustancial en la incidencia de algunos de estos patógenos, como es el caso de *Campylobacter*, *Listeria* y *Yersinia*, sin embargo, la incidencia de las enfermedades producidas por *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli* O157:H7, no ha presentado una declinación notoria (MMWR, 2003a).

Los patógenos bacterianos con mayor incidencia en las ETAs fueron *Salmonella* (16 %), *Campylobacter* (13,37 %) y *Shigella* (10,34 %) para el año 2002 (MMWR, 2003a).

En E.E.U.U., una de las enfermedades intestinales más comunes es aquella producida por *Salmonella spp.*, reportándose alrededor de 40.000 casos al año. En el año 2002, la incidencia de notificaciones fue alrededor de 16 casos por 100.000 personas, siendo los serotipos más comúnmente aislados *S. typhimurium* (19 %) y *S. enteritidis* (15 %) (MMWR, 2003a). La incidencia anual de *S. typhimurium* ha disminuído, desde una incidencia en 1999 de un 24 %, hasta un 19 % el 2002, a diferencia de *S. enteritidis* que en el mismo periodo aumentó su frecuencia de infecciones desde un 10 % a un 15 % (MMWR, 2000; MMWR, 2003a).

En Chile, en los últimos años, se ha producido un aumento en la incidencia de las enfermedades de transmisión alimentaria. Así lo reflejan las estadísticas del Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA), que inició a partir de 1994 una vigilancia epidemiológica de los brotes de ETA, en coordinación con los servicios asistenciales de salud. Desde el inicio del programa de vigilancia, las notificaciones de las ETAs han ido paulatinamente en aumento, desde cifras de 86 brotes por año en 1994 hasta alcanzar los 260 brotes en el año 2000. En el 67 % (174) de los brotes no se identificó el agente causal, principalmente debido a que no fue posible obtener muestras de alimentos. De 48 brotes (18,5 %) en que el estudio microbiológico resultó positivo, los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Salmonella spp.* no *typhi* (21/48) y *Staphylococcus aureus* (13/48) (Prado *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista económico, las infecciones por *Salmonella spp.* son una de las más importantes para la industria avícola. Las pérdidas económicas anuales producidas por efecto de la alta mortalidad entre las aves en producción en E.E.U.U se ha estimado en US\$ 77 millones de dólares (Nagaraja *et al.*,1991). Por otro lado, no sólo la pérdida por mortalidad de las aves es importante, ya que las que logran sobrevivir, quedan débiles y susceptibles a otras enfermedades, disminuyendo fuertemente su rendimiento productivo. Tanto o más importante que lo anterior, es la calidad microbiológica de los alimentos de origen aviar que son

consumidos por las personas, representando un riesgo serio para la salud pública (Nagaraja *et al.*,1991).

2.2 Clasificación taxonómica de las bacterias del género *Salmonella*.

La Salmonelosis es una enfermedad, causada por bacterias del género *Salmonella*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae.

Las salmonelas no forman parte de la flora bacteriana normal de los animales o del hombre, y cuando se encuentra, generalmente están en el tracto intestinal, aunque puede tener otras localizaciones según la especie animal (ovario en aves; articulaciones y aparato genital en equinos) (Carloni, 1996).

La clasificación taxonómica más utilizada es la descrita por Poppof y Le Minor (1992) que señala dos especies dentro del género *Salmonella*, *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se subdivide en seis subespecies; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. La serotipificación de *Salmonella spp.*, según el esquema de Kauffmann-White, se basa en la caracterización de los antígenos somáticos (O) y flagelar fase H1 y H2. Según éste, existen más de 2300 serotipos diferentes de *Salmonella* (Poppof y Le Minor, 1992).

2.3 Especies animales susceptibles a *Salmonella spp.*

Salmonella spp. infecta a una gran variedad de animales, tales como aves, reptiles, roedores, animales domésticos (bovinos, ovinos, equinos, cerdos, perros y gatos), y también al hombre.

Desde un punto de vista epidemiológico, el género *Salmonella*, se puede clasificar en tres grupos principales (Murray *et al.*,1999):

1. Patógenos adaptados al hombre, tales como *Salmonella typhi* y *paratyphi*, las cuales, debido a su alta adaptación a los seres humanos, no son patógenas para los animales domésticos ni silvestres.
2. Patógenos adaptados a los animales, tales como *Salmonella pullorum* y *gallinarum* en aves, *S. dublin* en bovinos, *S. abortus equi* en equinos, *S. abortus ovis* en ovejas y *S. choleraesuis* en cerdos. Algunos de estos pueden ser patógenos para el hombre, como *S. dublin* y *S. choleraesuis*.
3. Aquellas salmonelas patógenas que no presentan adaptación a una especie en particular (salmonelas zoonóticas), por lo que son capaces de pasar de los animales domésticos al hombre. Entre ellas, *S. newport*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*.

Los animales son los hospedadores y principales vectores de la salmonelosis zoonótica. Dentro de los animales, las aves domésticas representan uno de los reservorios más importantes de salmonelas, que actuarían como fuente de infección para la población humana (Gast, 2000).

Las aves silvestres y dentro de estas, las palomas, también representan un importante reservorio para *Salmonella spp.* En Chile, Toro *et al.*, (1999), en un estudio realizado en Santiago, Chile, determinaron que un 3% de palomas, aparentemente sanas, estaban infectadas con *Salmonella spp.* Esta situación representaría un alto riesgo epidemiológico para la población humana por su abundancia y distribución geográfica.

En el hombre, el factor epidemiológico más importante es el estado de portador. Después de una infección, muchos individuos siguen albergando las bacterias y eliminándolas, algunos en forma permanente, constituyendo una fuente de infección para el resto de la población (Carlioni, 1996).

2.4 Manifestaciones clínicas de la Salmonelosis en los animales y el hombre.

S. typhimurium, *S. dublin* y *S. newport* son los serotipos más frecuentes de aislar en el ganado bovino. En ellos, la enfermedad puede producir septicemia o limitarse al tracto digestivo. Como consecuencia de la septicemia puede ocurrir aborto. En los cerdos, la salmonelosis puede presentarse como una septicemia aguda y fulminante, destacándose los serotipos *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*. En equinos, el cuadro más frecuente es la diarrea, aunque puede presentarse septicemia. La Salmonelosis es poco frecuente en los perros y gatos, aunque se pueden encontrar normalmente en su tracto digestivo sin provocar signos clínicos. Cuando ocurre un brote en perros y gatos, generalmente están asociados a fuentes comunes de contagio (Hirsh, 1990).

Las infecciones por *Salmonella* en las aves se pueden agrupar en tres categorías: pulorosis, tifosis y paratifosis aviar.

La pulorosis es una enfermedad aguda sistémica, causada por *S. pullorum*, que afecta a pollos y pavipollos, principalmente en las tres primeras semanas de edad. Las aves presentan somnolencia, debilidad, pérdida de apetito, retardo en el crecimiento, jadeo y ceguera. La mortalidad varía entre 0 a 100 %. La tifosis aviar es provocada por *S. gallinarum*, la cual también se manifiesta como una enfermedad sistémica aguda o crónica, que afecta principalmente a las aves adultas. Las manifestaciones clínicas y lesiones son muy similares a la pulorosis (Gast, 2000).

Los cuadros de paratifosis son producidos por cualquiera de las salmonelas móviles. Aunque existen más de 2300 serotipos de salmonelas identificados, sólo alrededor de un 10 % de éstos han sido aislados desde aves domésticas. Afecta principalmente a aves jóvenes, presentando signos y lesiones idénticas a cualquier septicemia aguda. Los rangos de mortalidad bajo condiciones naturales

varía entre 10-20 %, dependiendo principalmente del ambiente, serotipo y presencia de infecciones concomitantes. En las aves adultas, la infección es asintomática, quedando las aves como portadoras (Gast, 2000).

Aunque la exposición a *Salmonella spp.* es frecuente, resulta necesario un inóculo elevado (10^6 - 10^8 bacterias) para el desarrollo de la enfermedad sintomática en el hombre (Murray *et al.*,1999).

En el hombre, la Salmonelosis se manifiesta más comúnmente como una enteritis, apareciendo los primeros síntomas a las 6 a 48 h después del consumo de alimento o agua contaminados, con un cuadro inicial de náuseas, vómitos y diarreas sin sangre. Todas las salmonelas pueden causar bacteremia, aunque las infecciones por *S. choleraesuis*, *S. paratyphi*, *S. typhi* y *S. dublin* conducen con más frecuencia a una fase bacterémica. El riesgo de bacteremia por *Salmonella spp.* se ve aumentado en los inmunodeficientes, niños y ancianos. Entre el 1 y el 5 % de los pacientes experimentan colonización crónica durante más de un año después de la enfermedad sintomática, y la vesícula biliar representa el reservorio en la mayoría de los casos (Murray *et al.*,1999).

2.5 Vías de infección por *Salmonella*.

Salmonella spp. infecta a los animales a través de la ruta fecal/oral, ya sea por transmisión directa entre los animales o transmisión indirecta, a través de aguas y alimentos contaminados, praderas contaminadas con aguas residuales, y por otros vectores, tales como roedores, aves silvestres e incluso el ser humano (Dargatz *et al.*, 1998), que a través de sus heces puede contaminar con diferentes serotipos de *Salmonella* los ingredientes utilizados para producir alimentos para animales. Así es como la presencia de proteínas de origen animal, en alimentos tales como harinas de pescado, de carne, de hueso, de sangre, de subproductos avícolas o de plumas, se ha relacionado con la contaminación del alimento terminado y ha resultado en una diseminación efectiva a los animales de abasto

de diferentes serotipos de *Salmonella*, tales como *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. virchow* y *S. berta* (McIlroy y Thompson, 1997).

La vía principal a través de la cual las personas se infectan con *Salmonella*, es por el consumo de alimentos contaminados, considerándose una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). El 85 % de las infecciones originadas por *Salmonella spp.* se asocian a bebidas, o alimentos contaminados como vehículos de infección. El consumo de alimento de origen animal crudo o mal cocido, principalmente carne de vacuno, pollo, huevos y leche, es una fuente potencial de infección para las personas, aunque otros tipos de alimentos también han sido implicados en la transmisión, tales como frutas o vegetales mal lavados (WHO, 1997; CDC, 2002b; Dargatz *et al.*, 1998).

La contaminación de productos cárnicos con *Salmonella* ocurre usualmente en las plantas de faenamiento, donde los equipos no sanitizados pueden servir como vehículo de transmisión de *Salmonella spp* desde carcasas infectadas a las no infectadas (Dargatz *et al.*, 1998).

Salmonella puede pasar a la cadena alimentaria desde la producción primaria o a través de contaminación cruzada de los productos alimenticios en el hogar o en los establecimientos de servicios de comida e instituciones como hospitales, hogares de ancianos o salas cunas, donde los diferentes utensilios y superficies usadas para preparar los alimentos y que tuvieron contacto con alimentos crudos contaminados, pueden ser fuente de infección para otros alimentos no contaminados. La manipulación de alimentos, sobretodo por portadores asintomáticos, origina a menudo brotes epidémicos, por vía de transmisión oral-fecal (WHO, 1997).

En los países desarrollados la transmisión de persona a persona es inusual pero puede ocurrir. Sólo el 10 % aproximadamente de las infecciones, se

transmite de persona a persona o mediante fómites, siendo esta la vía de transmisión más frecuente en el medio hospitalario (Anón, 2002).

La infección por *Salmonella* también puede ocurrir por manipulación de animales de compañía, perros, gatos, y particularmente reptiles como serpientes, tortugas y lagartijas (CDC, 2002b). En 1999, en E.E.U.U, se reportaron 3 brotes de *S. typhimurium* resistente a antibióticos en clientes y empleados de Clínicas Veterinarias de pequeños animales y en refugios de animales. No se conoce como las personas involucradas en estos brotes se infectaron con *Salmonella*, sin embargo, la ingestión inadvertida de las heces, o el alimento contaminado con heces de animales involucrados, en este caso gatitos, podría haber resultado producto de deficientes prácticas de higiene en estas instalaciones veterinarias (MMWR, 2001).

2.6 Epidemiología de la Salmonelosis en el hombre.

El consumo de carne de pollo, huevos y subproductos avícolas como fuente de proteínas de origen animal para el hombre se ha incrementado en los últimos años, alcanzándose a nivel mundial, un consumo individual de carne de pollo, durante el 2002, de 11,5 kg/habitante/año. En Chile fue mayor aún, con 28,3 kilos/persona (ODEPA, 2003).

Los productos de origen avícola frecuentemente se han asociado a brotes de toxiinfección alimentaria en humanos producidos por *S. enteritidis*. La infección en humanos ocurre principalmente por el consumo de carne de pollo, huevos y sus derivados (mayonesa, salsas, merengue, helados), pero también se describe la carne de cerdo, vacuno y leche como fuentes de infección, cuando éstos se encuentran insuficientemente cocidos (McIlroy y Thompson, 1997).

A nivel mundial, numerosos estudios revelan que tanto los planteles productores de pollos broiler (Padrón, 1990; Carraminana *et al.*, 1997) como los

planteles de gallinas ponedoras de huevos (Yamane *et al.*, 2000; Davies y Breslin, 2001) pueden estar infectados con *Salmonella spp.*

Entre los estudios realizados, Roy *et al.*, (2002) analizaron diferentes muestras provenientes de planteles de pollos broiler de Washington (E.E.U.U) para comprobar la prevalencia de *Salmonella spp.* en el medio ambiente avícola. Se analizaron muestras ambientales tales como plumones de pollitos obtenidos de las incubadoras donde se incuban huevos de abuelas broiler y de reproductoras de engorda broiler, así como hisopos de arrastre tomados en los galpones. De todas las muestras analizadas, un total de 569 (11,9 %) fueron positivas a *Salmonella spp.* Dentro de las muestras positivas, 15,04 % fueron de los plumones de pollitos obtenidos de las incubadoras donde se encuentran los huevos de abuelas broiler y de reproductoras de engorda broiler, 12 % fueron de los hisopos de arrastre tomados en los galpones, 34,17 % y 8,27 % fueron de las muestras de agua empleada para lavar gallinas de desecho y pollo de engorde, respectivamente, 29,48 % fueron de carne de pollo molida y un 1,6 % corresponde a muestras clínicas tales como hígado, contenidos del saco vitelino y ciego, comprobando la presencia de *Salmonella spp.* dentro de los planteles avícolas.

En Japón, entre 1995 y 1997, se estudió la prevalencia de *Salmonella spp.* en planteles de pollos broiler, donde se analizaron un total de 2345 muestras de contenidos cecales y que correspondían a 28 planteles de 12 granjas diferentes. Se aisló *Salmonella spp.* desde 336 muestras, lo que corresponde a un 14,3 % del total de muestras, provenientes de 18 de los 28 planteles (64,3 %), y de 9 de las 12 granjas (75 %) (Limawongpranee *et al.*, 1999).

Estudios realizados en planteles de gallinas ponedoras de huevos en Holanda, reportaron la presencia de *Salmonella spp.* en 23 (47 %) de los planteles analizados (van de Giessen *et al.*, 1991). En E.E.U.U., Ebel *et al.*, (1992) determinaron que la prevalencia promedio fue de un 86 % de planteles positivos a

Salmonella spp. de un total de 406 planteles analizados en diferentes regiones del país (norte, sudeste, y central/occidente).

Los diferentes productos derivados de la industria avícola también pueden estar contaminados con *Salmonella spp.* Así lo demostró un estudio realizado en Washington, E.E.U.U, donde se analizó la carne cruda de diferentes especies que se comercializan al por menor en diferentes locales de la ciudad. Se analizaron 4 tipos de productos cárneos crudos (carne de vacuno, de pollo, de pavo y cerdo), siendo la carne de pollo la que presentó la tasa más alta de contaminación para diferentes agentes bacterianos (*Campylobacter* 70,7 %; *E. coli* 38,7 % y, por supuesto, *Salmonella spp* 4,2 %) (Zhao, *et al.*, 2001). En otro estudio, se analizó la carne de pollo molida, agua empleada para lavar las gallinas de desecho y de pollos broilers. De todas las muestras analizadas, un total de 569 (11,9 %) fueron positivas a *Salmonella spp.*, siendo las muestras de agua empleadas para lavar gallinas de desecho, las que presentaron el más alto porcentaje de muestras positivas a *Salmonella spp.* (34,17 %), seguida por la carne molida de pollo (29,48 %) y el agua de lavado de carcasas de pollos broiler (8,27 %) (Roy *et al.*, 2002).

La contaminación de los huevos también se ha convertido en un importante vehículo de transmisión de *Salmonella spp.*, siendo *S. enteritidis* (SE) el serotipo más frecuentemente aislado de los brotes donde se ha involucrado el consumo de huevos. De un total de 677 brotes de *S. enteritidis* reportados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de E.E.U.U, durante los años 1990-2001, a 309 de ellos se le asoció un vehículo de transmisión, con 241 casos (78 %) asociados al consumo de huevos crudos o mal cocidos. Entre 1996-1998 en diferentes regiones de E.E.U.U, se produjeron 141 brotes, con un total de 3267 enfermos, donde se vieron involucrados diferentes tipos de alimentos (*cheesecake*, lasagna, chiles rellenos, salsa holandesa) que son preparados con huevos crudos o mal cocidos (MMWR, 2000; MMWR, 2003b).

Se ha demostrado que *S. enteritidis* es el serotipo que coloniza más frecuentemente los órganos del tracto reproductivo en gallinas ponedoras adultas, lo que explicaría los brotes de Salmonelosis en humanos causados por huevos contaminados por *S. enteritidis* (Okamura *et al.*, 2001). Sin embargo, Williams *et al.*, (1998), demostraron la transmisión transovárica de *S. typhimurium* en gallinas ponedoras, inoculadas experimentalmente vía oral; de hecho el año 2001, en Australia, se reportó un brote de *S. typhimurium*, donde la fuente de infección correspondió a un postre elaborado con huevo crudo (Hall, 2002).

En Chile, en los años 1998 y 1999, en la Región Metropolitana (RM), el SESMA realizó un estudio de vigilancia de productos avícolas. El muestreo se llevó a cabo en diferentes distribuidoras avícolas, supermercados y plantas faenadoras. Los productos avícolas muestreados fueron, 1524 muestras de carne y menudencias de pollo, y 1081 muestras de huevo en venta en la RM. De las 1524 muestras de carne y menudencias de pollo, en 144 muestras (9,44 %) se aisló *Salmonella spp.*, de las cuales, 108 muestras (75 %) correspondieron a *S. enteritidis*. De las 1081 muestras de huevo analizadas, se determinó una frecuencia de contaminación de 0,09 % correspondiente a la fracción de yema de huevo, mientras que no se detectó *S. enteritidis* (SE) en las cáscaras de huevos. De acuerdo a los resultados, los autores señalan que la presencia de SE en productos avícolas de consumo humano en la RM constituyen un foco de infección para la población (Alexandre *et al.*, 2000).

2.7 Control y prevención de la Salmonelosis en el hombre.

A nivel mundial hay preocupación por la presencia de *Salmonella spp.* en los productos avícolas, debido al gran impacto que puede producir en la salud pública. Es así, como diferentes países del mundo, además de distintas organizaciones e instituciones, han establecido que cualquier estrategia de control debe tener como primer objetivo la reducción de la incidencia de la infección en la producción avícola (Barrow, 1993). Para realizar este control, Barrow (1993) señala que se

deben monitorear tres puntos fundamentales dentro de la producción avícola: en las aves reproductoras, en el alimento y en las aves en producción y su medio ambiente más próximo.

En 1992, en Europa, se crea una directiva de zoonosis de la Unión Europea, que armoniza en todos los países de la UE, el registro, muestreo y análisis de parvadas de gallinas reproductoras. El sacrificio obligatorio debido sólo a la infección de *S. enteritidis* aún se lleva a cabo en algunos países donde los gobiernos locales pagan una compensación (McIlroy y Thompson, 1997). Sin embargo, la eliminación de las aves infectadas, no dará una solución a largo plazo, a menos que se prevenga la reinfección (Barrow, 1993).

Por lo anteriormente dicho, debe usarse alimento libre de *Salmonella spp.* y esto sólo se puede alcanzar por medio de una descontaminación efectiva del alimento balanceado, con un tratamiento térmico adecuado o la inclusión de ácidos orgánicos y la prevención subsecuente de la recontaminación durante el proceso, almacenamiento y transporte, además de un adecuado monitoreo de las materias primas (McIlroy y Thompson, 1997).

Medidas tales como el uso de antibióticos, exclusión competitiva y vacunación también pueden ser utilizadas para reducir la susceptibilidad de las aves a *Salmonella spp.* (Gast, 2000). La vacunación con bacterinas se ha practicado por muchos años, aunque actualmente se usan vacunas vivas atenuadas para reducir la excreción fecal y la localización ovárica de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. (Barrow, 1993). Con respecto al uso de antibióticos, sólo deben usarse aquellos que no causen resistencia contra drogas usadas en humanos, ya que la resistencia antimicrobiana de *Salmonella spp.* también puede llegar a constituir un riesgo para la salud pública (WHO, 1993).

Toda medida, para lograr una mayor eficacia, debe ser aplicada en conjunto con un programa de estricta higiene y manejo del medio ambiente en la cual son

criadas las aves (WHO, 1993). Medidas estrictas de bioseguridad deben ser implementadas, como por ejemplo, restringir la entrada a los planteles de las aves, sólo a los equipos y personal autorizado, previniendo así, la transmisión horizontal de *Salmonella* entre los galpones. Únicamente deben usarse galpones que sean libres de infección, y esto requiere establecer manejos y monitoreos serológicos y bacteriológicos periódicos tanto de las aves de producción, como del medio ambiente de los planteles, incluyendo el control de roedores, insectos y aves de vida libre, ya que estos animales frecuentemente se asocian con el remanente de la infección de parvada en parvada. Es por esto también, que los planteles deben ser desinfectados y limpiados por procedimientos recomendados, entre ellos, la desinfección con derivados de amonio cuaternario. También se han propuesto mejoras en la construcción de los pabellones en todos los niveles de crianza y producción, de tal manera que sean fáciles de limpiar y desinfectar, permitiendo que las aves se mantengan libres de una gran cantidad de agentes infecciosos. Medidas más costosas, como presión de aire positivo y el uso de filtros de aire en los pabellones pueden ser consideradas a futuro (Barrow, 1993; McIlroy y Thompson, 1997)

Idealmente, los planteles deberían colonizarse con pollitos de un día, libres de *Salmonella spp*, que provengan de parvadas reproductoras monitoreadas con cierta regularidad y que estén certificadas como libres de infección (WHO,1993).

2.8 Técnicas diagnósticas utilizadas en la detección de *Salmonella spp.* en productos avícolas.

La industria avícola tiene que buscar rutinariamente *Salmonella spp.* en su cadena de producción, para evaluar los riesgos de contaminación de sus productos y lo deseable, es que este monitoreo se realice con ensayos que tengan alta especificidad y sensibilidad, y pueda ser aplicado a un gran número de muestras, a bajo costo, con una rápida obtención de resultados. Lo ideal es que la técnica utilizada pueda detectar *Salmonella spp.* En el 100 % de muestras

contaminadas sin embargo, la eficiencia de la técnica se ve afectada por el gran número de serotipos presentes y el método usado. De hecho, la selección de las muestras a obtener de un animal enfermo es tan importante como la selección del método a utilizar para realizar el aislamiento (Murray y Barton, 1987).

2.8.1 Diagnóstico de *Salmonella* spp. por cultivo bacteriológico.

Una gran variedad de medios líquidos y sólidos selectivos han sido desarrollados para realizar el aislamiento de esta bacteria. Por otra parte, los laboratorios con vasta experiencia en el aislamiento de *Salmonella* han desarrollado y adoptado los procedimientos más adecuados para este fin (Murray y Barton, 1987).

Muchos de los métodos estándares siguen un esquema general que involucran cuatro pasos principales: 1) pre-enriquecimiento no selectivo; 2) enriquecimiento selectivo; 3) crecimiento en medio de agar selectivo; 4) pruebas bioquímicas y serología. Todo esto hace que el método sea laborioso, largo y costoso. En general, los procedimientos estándares para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. toman aproximadamente de 4 a 7 días para obtener los resultados (Wray y Davies, 1994).

a) Medios de pre-enriquecimiento no selectivo para aislamiento de *Salmonella* spp.

El agua peptonada fosfatada (APF) es el medio de elección para realizar el pre-enriquecimiento. Murray y Barton (1987), recomiendan la utilización de este medio sólo en muestras alimentarias, siendo innecesario en muestras clínicas. Este medio se ha visto que es particularmente beneficioso en casos en que la bacteria necesita una reactivación, después que ha sufrido procesos de congelamiento, desecación, u otra condición estresante. La muestra se incubaba con el agua peptonada fosfatada por 16-24 h a 37 °C (Murray y Barton, 1987).

b) Medios de enriquecimiento selectivo para aislamiento de *Salmonella* spp.

Como el nombre lo dice, los medios de enriquecimiento selectivo son usados en aquellas muestras que contienen flora bacteriana mixta (heces, tejidos, alimentos, muestras ambientales), para favorecer la multiplicación de *Salmonella*. Esto se logra mediante el uso de un medio líquido, que contiene nutrientes y agentes selectivos que inhiben o retardan el desarrollo de bacterias no deseadas. Son de mucha utilidad en aquellas muestras que tienen un bajo número de bacterias, como es el caso de individuos portadores, en que la probabilidad de aislar colonias, por medio de la siembra directa, es bajo (Le Minor, 1984).

Existen muchos medios de enriquecimiento, y modificaciones de éstos, para realizar el aislamiento de *Salmonella*. Tres medios de enriquecimiento selectivos son usados comúnmente: caldo Rappaport-Vassiliadis, caldo Selenito (selenitocistina, selenito verde brillante, etc.), y caldo Tetrionato (Tetrionato verde brillante, Mueller-Kauffman, Hajna, y Tetrionato adicionado con novobiocina) (Wray y Davies, 1994). Algunos, sin embargo pueden ser tóxicos para algunos serotipos, como por ejemplo el caso de *S. typhisuis*, *S. choleraesuis*, *S. pullorum*, y *S. gallinarum* que son inhibidos por los caldos Selenito y Tetrionato (Carter, 1984).

La eficiencia de los medios selectivos de enriquecimiento está influenciada por el tipo de muestra a analizar, la proporción del inóculo adicionado al medio, y el tiempo y temperatura de incubación usado. Es así, como el caldo Selenito y el Tetrionato se ven disminuídos en su rendimiento por la presencia de ciertos productos, como por ejemplo la albúmina (Carter, 1984).

Los caldos de enriquecimiento son incubados a 41-42 °C por 24-48 h. Es importante el constante monitoreo de la temperatura de la incubación, ya que se

ha visto que temperaturas superiores a 43 °C pueden inhibir el desarrollo, y en algunos casos, ser letal para *Salmonella* (Wray y Davies, 1994).

Enriquecimiento secundario retardado: este tipo de enriquecimiento ha sido utilizado principalmente con caldo Tetrionato. La muestra se incuba en caldo Tetrionato por 18-24 h, luego se siembra en placa de agar, y se deja a temperatura ambiente por 5 días. Si no se obtiene crecimiento de *Salmonella* en la placa, 0.5-1.0 ml del caldo de enriquecimiento tetrionato original se transfiere a un tubo con 10 ml de caldo Tetrionato fresco. Éste es incubado por 18-24 h a 37 °C y se siembra en placas de medios selectivos diferenciales (Wray y Davies, 1994). Waltman *et al.*, (1993), demostraron que el tiempo óptimo de incubación para realizar el aislamiento de *Salmonella spp* fue de 24 h en caldo Tetrionato, seguido de 5 días de enriquecimiento secundario y sembradas posteriormente en placas de agar Verde brillante adicionado con 20 µg/ml de novobiocin (BGNA), y placas de agar Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4), logrando detectar 96-98 % de las muestras positivas a *Salmonella spp*, comparado con un 55 % y 71% de muestras positivas de las muestras incubadas 24 h y 48 h en caldo Tetrionato y posterior siembra en placas de agar BGNA y XLT4 respectivamente. Además, incrementó significativamente el aislamiento de *Salmonella spp*. tanto en muestras ambientales como clínicas.

c) Medios selectivos diferenciales usados en el aislamiento de *Salmonella spp*.

Luego de la incubación de la muestra en el medio de enriquecimiento, se procede a realizar la siembra en medios sólidos. Estos medios contienen varios agentes selectivos y diferenciales que facilitan el aislamiento y diferenciación de las colonias de *Salmonella spp*. de otras colonias bacterianas (Wray y Davies, 1994).

Estos medios se clasifican según su selectividad en moderada, intermedia e intensa.

- Selectividad Moderada: Permite el crecimiento de todas las enterobacterias y todas las salmonelas. Entre estos está el agar Mc Conkey y agar Citrato Desoxicolato.
- Selectividad Intermedia: inhiben algunas enterobacterias pero desarrollan todas las salmonelas. Ej. Agar Verde Brillante.
- Selectividad Intensa: inhiben la mayoría de las enterobacterias, pero también algunas salmonelas. Ej: agar *Salmonella-Shigella*, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) (Carloni, 1996; Koneman *et al.*, 1988).

En general, se recomienda que al menos 2 tipos diferentes de medios selectivos en agar sean utilizados para realizar el aislamiento de *Salmonella spp.* y, a menos que otra especificación lo indique, las placas de agar se incuban a 35-37 °C por 18-24 h (Wray y Davies, 1994).

Los medios más utilizados son agar Verde-Brillante, agar MacConkey, y agar *Salmonella-Shigella* (SS). Al igual que los medios de enriquecimiento, estos medios también pueden presentar inhibición para algunos serotipos, como por ejemplo, el agar Verde-Brillante puede inhibir *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhi*, *S. choleraesuis*, y *S. typhisuis* (Carter, 1984).

d) Confirmación de género y serotipo.

Cada colonia sospechosa debe ser confirmada como *Salmonella*. Esta confirmación se realiza a través de pruebas bioquímicas, donde se determinan las características fenotípicas y metabólicas que reflejan el código genético y la identidad única del organismo en estudio. Existen distintas pruebas y numerosos esquemas para lograr la identificación final de la bacteria. Algunas de estas pruebas incluyen utilización de carbohidratos, producción de indol, rojo de metilo,

utilización de citrato, producción de ureasa, producción de fenilalanina deaminasa, producción de H₂S, etc. (Koneman *et al.*, 1988).

En muchos laboratorios de diagnóstico veterinario, los aislamientos de salmonelas son examinados serológicamente para determinar el serogrupo al cual pertenece. La utilización de antisueros polivalentes son necesarios para lograr la confirmación de que el aislamiento realizado pertenece al género *Salmonella*. Estos antisueros contienen aglutininas para los antígenos O y Vi, representando aproximadamente el 95 % de las salmonelas aisladas en los laboratorios clínicos. Este procedimiento se hace a través de una aglutinación simple en placa con sueros polivalentes (Coyle *et al.*, 1985).

2.8.2 Técnicas de diagnóstico rápido de *Salmonella spp.*

La lentitud con que la mayoría de las técnicas microbiológicas entregan los resultados, muchas veces cuando los productos ya han sido procesados, e incluso consumidos, hace que la rapidez en la obtención de los resultados deba considerarse en el contexto de los modernos sistemas de aseguramiento de la calidad (Álvarez *et al.*, 1999).

Además, los productores aumentan sus costos de producción debido al costo extra que significa el mantener sus aves confinadas hasta confirmar el estatus sanitario del galpón, o por el retiro de todos los productos avícolas si estos están contaminados con *Salmonella spp.*, después de haber dejado la planta de procesamiento. Es por eso, que muchas técnicas rápidas de diagnóstico han sido desarrolladas como método de *screening* para *Salmonella spp.* en los diferentes productos avícolas (Peplow *et al.*, 1999).

En los últimos años, se ha observado un importante desarrollo en los procesos de miniaturización, automatización, computación, como también un progreso en la inmunología y biología molecular, que han permitido el

perfeccionamiento de las técnicas diagnósticas microbiológicas que se llevan a cabo en los diferentes laboratorios del mundo (Blivet *et al.*, 1998). Las pruebas rápidas de detección de *Salmonella* reducen el tiempo de aislamiento a 1 día o un poco más, y muchas pueden incluso automatizarse. Los principales problemas que tienen los métodos rápidos de detección es su alto costo, la necesidad de un medio de enriquecimiento para lograr suficiente cantidad de células bacterianas, y el tener una especificidad menor a la obtenida con los métodos convencionales de cultivo (Gast, 2000).

El número de técnicas rápidas de diagnóstico microbiológico se ha incrementado en forma notable en las últimas décadas, entre las cuales podemos mencionar métodos basados en la modificación de los procedimientos convencionales dirigidos a reducir el tiempo de análisis (medios modificados, filtración por membrana), medición de la actividad metabólica de los microorganismos mediante el uso apropiado de un medio selectivo (impedancia /conductancia), métodos inmunológicos (ELISA, inmunofluorescencia, separación mediante perlas inmunomagnéticas) y detección de ácidos nucleicos (Hibridación con sondas, PCR) (Blivet *et al.*, 1998).

2.8.2.1 Modificación de métodos convencionales.

Lo que se busca con estos procedimientos es disminuir el tiempo utilizado en la etapa de enriquecimiento selectivo utilizado en el cultivo bacteriológico estándar.

a) Filtración por membrana hidrofóbica (*Hydrophobic grid membrane filter*).

Entis *et al.*, (1982), desarrollaron una técnica de filtración por membrana hidrofóbica para la detección de *Salmonella spp.* desde muestras de alimento, presentando una tasa de detección (94,6 %), similar a aquella obtenida por el cultivo bacteriológico estándar (96,7 %), obteniendo los resultados 2-3 días

después de recibir las muestras en comparación con los 3-4 días necesarios para obtener los resultados por el cultivo bacteriológico estándar. Esta técnica consiste en un pre enriquecimiento (24 h), y un enriquecimiento selectivo por un tiempo muy corto (6 h), para luego ser filtrada y sembrada en medios selectivos diferenciales.

Por otro lado, Capita *et al.*, (2001), al realizar la detección de *Salmonella spp.* en diferentes productos avícolas (carcasas; partes de pollo, tales como alas, patas, menudencias, hígados y corazón; y hamburguesas de carne de pollo), utilizando filtración por membrana hidrofóbica y siembra en agar EF-18, obtuvo altas tasas de resultados falsos positivos (78,75 %; 81,67 %; 80 % en cada tipo de muestra analizada, respectivamente), presentando una baja especificidad para la detección de *Salmonella* en productos avícolas.

b) Medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV).

El principio de esta técnica consiste en la migración por quimiotaxis de las *Salmonelas* móviles a través de un medio altamente selectivo (Blivet *et al.*, 1998).

Zdragas *et al.*, (2000), desarrollaron esta metodología para detectar *Salmonella* en muestras de productos avícolas, tales como, intestino y otros órganos internos (hígado, bazo, corazón, vejiga urinaria). La técnica consiste en un preenriquecimiento de la muestra en agua peptonada fosfatada por 24 h, para luego inocular las placas de Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado con 3 gotas del medio de preenriquecimiento, siendo incubado a 42 °C por 24 h. La migración bacteriana se observa como una zona turbia, de color grisáceo, alrededor de las gotas inoculadas, lo que se considera como muestras presuntamente positivas, por lo que se realizan pruebas bioquímicas y serológicas para su confirmación. La técnica presentó una sensibilidad y especificidad del 100 % en ambos tipos de muestras analizadas, obteniendo los resultados 48 h después de haber recibido las muestras (Zdragas *et al.*, 2000).

2.8.2.2 Técnicas basadas en la medición del metabolismo bacteriano.

La técnica de impedimetría, se basa en la medición de los cambios en la composición iónica o conductancia del medio de cultivo producido por el metabolismo bacteriano. Esta es medida a través de un analizador microbiológico conectado a un computador. La curva de cambio de conductancia en función del tiempo, es similar a una curva de crecimiento, donde el inicio de la fase exponencial de la curva coincide con el tiempo de detección. Las muestras positivas deben ser confirmadas mediante método bacteriológico estándar (Blivet *et al.*, 1998).

El método de detección de *Salmonella* desarrollado por Schinking (2003), consiste en un pre-enriquecimiento en agua peptonada fosfatada por 6-8 h, luego un enriquecimiento selectivo en caldo Rappaport-Vassiliadis y Selenito-Cístina por 24 h, para luego utilizar este medio para la medición de la impedancia en el equipo *BacTrac 4300*. Esta técnica presentó una sensibilidad y especificidad de 96,2 % y 94,5 %, respectivamente.

La especificidad de este método está limitada por la selectividad del medio usada para medir la impedancia, por lo que la mayoría de los protocolos de impedimetría han presentado una baja eficiencia (Blivet, *et al.*, 1998).

2.8.2.3 Técnicas inmunológicas.

Estos métodos de detección se basan en el uso de anticuerpos, los cuales reaccionan con los antígenos, somáticos o flagelar, presentes en la célula bacteriana a detectar. Estos anticuerpos pueden ser mono o policlonales.

a) Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Los inmunoensayos más comunes corresponden a los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), donde una enzima se encuentra unida a un anticuerpo específico contra el microorganismo a detectar. Luego de la reacción antígeno/anticuerpo, se añade un sustrato, el cual cambia de color en presencia de la enzima, detectando la presencia del microorganismo (Blivet *et al.*, 1998).

Wyatt *et al.*, (1996), desarrollaron un ELISA de captura, donde utilizaron para la etapa de captura, anticuerpos flagelares policlonales y para la detección un anticuerpo monoclonal específico para la especie *Salmonella*. Con esta técnica, lograron detectar la bacteria a partir de muestras de la industria avícola (menudencias y agua de lavado de canales de pollo), en 30 h, en comparación a los 4 a 5 días requeridos por el cultivo bacteriológico estándar. La prueba presentó una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 75 %, 89 %, 92 % y 68 %, respectivamente, donde lo más relevante fue la obtención de una alta tasa de resultados falsos negativos (25 %), lo que puede traer como consecuencia la no detección de *Salmonella*, con el consiguiente riesgo que esto significa.

Otra prueba de ELISA de captura, para la detección de *S. enteritidis* a partir de piel, carne y huevos de pollo, desarrollaron Brigmon *et al.*, (1995), presentando una sensibilidad de detección de 10^4 células/ml en cultivo puros y con 10 % de carne de pollo (p/v), 10^5 células/ml en 10 % piel de pollo (p/v), y de 10^7 células/ml en 10 % de huevos (p/v), lo que prueba la gran variabilidad de la sensibilidad de la prueba de ELISA según el tipo de muestra analizada.

Rigby (1984), desarrolló y evaluó una prueba de ELISA de competencia o de inhibición, utilizando diferentes tipos de muestras (heces, paja, agua de lavado de canales, alimento para aves) para la detección de *Salmonella spp.* La prueba se basa en la inhibición de la unión del suero anti-O polivalente (serogrupo A hasta

G) a los lipopolisacáridos (LPS) absorbidos en la superficie de las microplacas, por el LPS de *Salmonella spp.* presente en las muestras. Esta prueba presentó una sensibilidad y especificidad de 95 % y 100 %, respectivamente, y un costo aproximado en tiempo (48 h) y materiales para el desarrollo de la prueba mucho más bajo que aquella requerida para el cultivo bacteriológico estándar. La prueba de ELISA es de gran utilidad como método de *screening*, para identificar muestras positivas, las cuales deben ser sometidas a cultivo para su confirmación (Rigby, 1984).

b) Filtración inmunomagnética.

La filtración inmunomagnética, es una nueva técnica que se basa en la utilización de partículas magnéticas, sensibilizadas con anticuerpos específicos contra la bacteria blanco, logrando el aislamiento selectivo de la bacteria desde una población bacteriana mixta. Este método no involucra el crecimiento bacteriano, pudiendo acortar los tiempos requeridos para realizar el aislamiento. La reacción de las partículas con los microorganismos se produce cuando éstas son mezcladas con una suspensión bacteriana que se encuentra en un medio de preenriquecimiento. Las bacterias se adhieren a los anticuerpos específicos de la superficie de las partículas por una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, las partículas son extraídas del medio líquido mediante la aplicación de un campo magnético. Las bacterias adheridas a las mismas son arrastradas en este proceso, se resuspenden, y se inoculan en medios selectivos, incubándose a 37 °C durante 24 h (Álvarez *et al.*, 1999). Esto permite acortar el tiempo del ensayo en 18 h aproximadamente, con respecto al cultivo bacteriológico estándar. Este ensayo se asocia usualmente a otra técnica para realizar la detección de *Salmonella*, tales como siembra en medios sólidos, ELISA, hibridación con sondas de ADN, PCR o impedimetría.

c) Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia también ha sido utilizada para realizar la detección de *Salmonella spp.* a partir de muestras pertenecientes a la industria avícola. Así lo demostraron, Cloak *et al.*, (1999), quienes realizaron la detección de *Salmonella spp.* a partir de muestras de carne de pollo, que fueron incubadas en agua peptonada fosfatada a 37 °C por 18 h. Las células bacterianas, fueron aisladas desde el medio de enriquecimiento a través de la adhesión superficial sobre una membrana de policarbonato adherida a un portaobjeto. Las bacterias adheridas a la membrana de policarbonato, fueron detectadas a través de la utilización de un anticuerpo marcado con fluoresceína, el cual es específico para los antígenos O y H de Salmonelas, y la visualización de esta reacción en un microscopio óptico de inmunofluorescencia. Esta técnica presentó una concordancia de un 100 % con respecto a los resultados obtenidos por el cultivo bacteriológico estándar, sin presentar resultados falsos positivos ni negativos, y detectando *Salmonella* en menos de 24 h. Además, la técnica presentó una sensibilidad de detección de \log_{10} 3,5 ufc/ml previo del cultivo de enriquecimiento, determinada a través de la inoculación experimental de *S. enteritidis* en muestras de carne de vacuno (Cloak *et al.*, 1999).

Si bien, las técnicas inmunológicas pueden reducir ostensiblemente los tiempos de detección de *Salmonella*, hay que tener en cuenta, la necesidad de una gran cantidad de células para que la reacción antígeno/anticuerpo se pueda detectar, lo que conlleva a la utilización de medios de pre-enriquecimiento por una gran cantidad de horas para obtener el número de células deseados. Además, la presencia de reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos de *Salmonella*, puede representar un gran problema para estos tipos de técnicas diagnósticas (Blivet *et al.*, 1998).

2.8.2.4 Técnicas de detección de ácidos nucleicos.

Las técnicas de biología molecular permiten detectar zonas de ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN, que son específicas de cada microorganismo. Su aplicación en microbiología clínica surge como una necesidad para detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos, o desarrollo tardío, y donde otras técnicas de detección carecen de suficiente sensibilidad y especificidad diagnóstica (Dieffenbach y Dveksler, 1995).

Las técnicas diagnósticas de detección de ácidos nucleicos más utilizadas en el ámbito del diagnóstico clínico, son: A) Hibridación y B) la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

a) Hibridación de ácidos nucleicos.

Khan y Nguyen (1995), desarrollaron una sonda de ADN recombinante de 2,1 pares de kilobases, específica para *Salmonella*, y la utilizaron para la detección de *S. enteritidis*. Esta sonda presentó hibridación con el ADN de otros 18 serotipos de *Salmonella*, pero no con el ADN de otros 17 géneros de bacterias entéricas y no entéricas, las cuales se piensa que están genéticamente relacionadas a *Salmonella*. Además, esta sonda se unió específicamente al ADN de 6.0 pares de kilobases de *S. enteritidis*, diferenciándolo claramente de los otros serotipos de *Salmonella*. A pesar de la alta especificidad de esta técnica, posee una baja sensibilidad, lo que la hizo poco útil para el diagnóstico, empleándose principalmente como prueba confirmatoria del diagnóstico de *Salmonella*.

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La técnica más utilizada en el diagnóstico microbiológico dentro de la biología molecular, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que

debido al proceso de amplificación de una región específica del ADN del microorganismo, aumenta considerablemente la sensibilidad de la prueba.

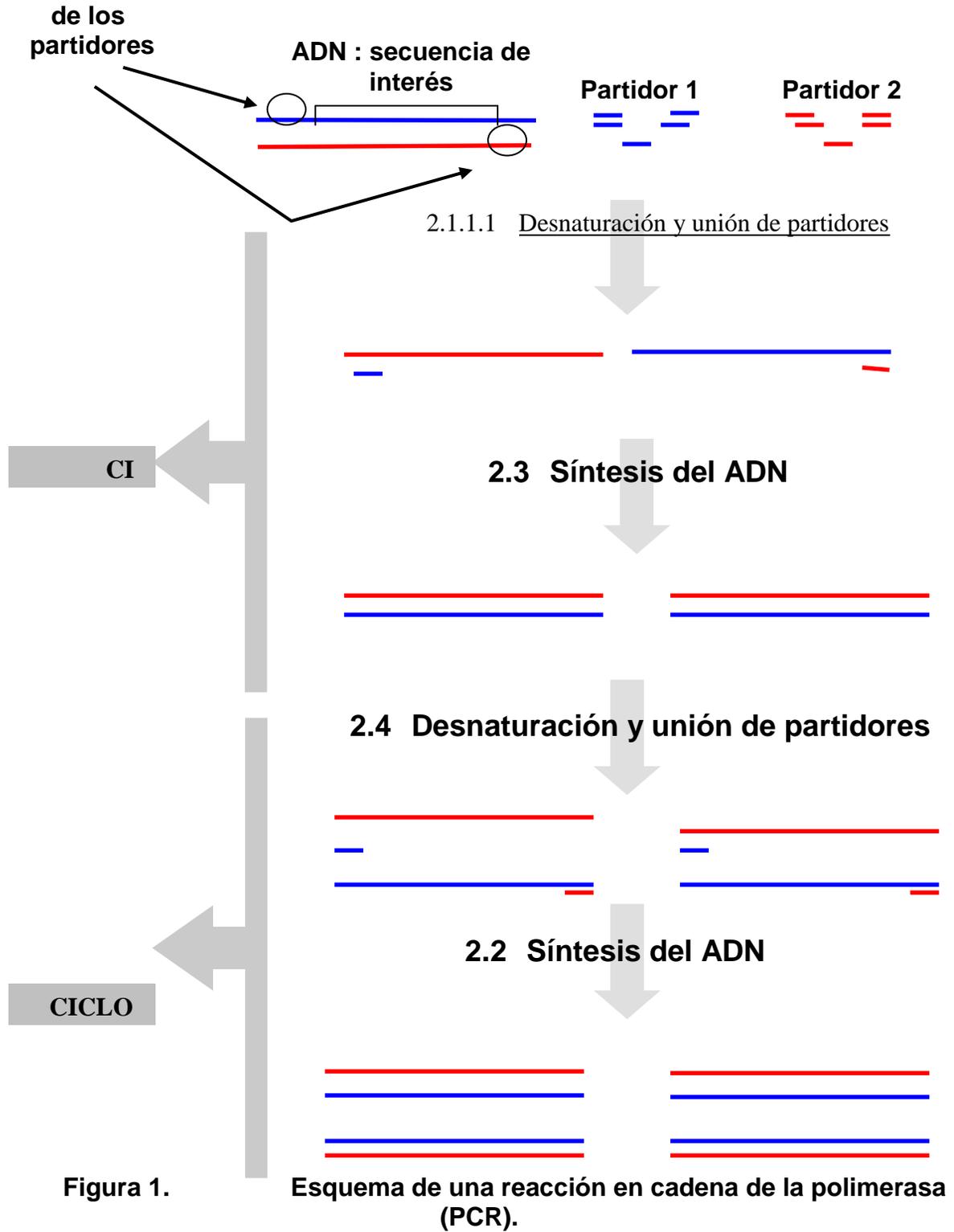
En el diagnóstico microbiológico, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una poderosa herramienta, resultando de gran utilidad en el diagnóstico y el estudio molecular de los virus y microorganismos. Brevemente, esta técnica consiste en obtener múltiples copias de una región específica del ácido nucleico por la acción de una polimerasa termoestable. Esto se logra a través de ciclos sucesivos, cada uno de los cuales tiene tres pasos: 1) desnaturación del ácido nucleico, 2) alineación de los partidores a la región a amplificar, 3) síntesis de una nueva copia de la región específica (elongación o extensión) (Dieffenbach y Dveksler, 1995) (Figura 1).

La amplificación del ADN en el PCR puede ser inhibida por sustancias presentes en las muestras (hemoglobina, bilis, sales, $MgCl_2$, etc.), como también por componentes del medio de cultivo usado para el aislamiento selectivo de la bacteria patógena. Es así, como se ha visto que el uso de un procedimiento de enriquecimiento, previo a la realización del PCR es útil para diluir las sustancias que inhiben la reacción y, además aumenta la sensibilidad de detección, producto de la multiplicación del microorganismo (Stone *et al.*, 1994).

En 1994 se comparó el PCR con métodos bacteriológicos estándares en la detección de *Salmonella spp.* en piel de pollo, logrando demostrar que el PCR es más rápido y más sensible que los métodos bacteriológicos, encontrando un total de un 15 % (10/68) de muestras positivas por PCR, comparado con el 7,4 % (5/68) detectado por cultivo (Mahon *et al.*, 1994).

En otro estudio, se comparó el PCR usando partidores específicos para el género *Salmonella spp.* y el cultivo bacteriológico (Cohen *et al.*, 1994). Cincuenta muestras de tómulas cloacales fueron analizadas usando PCR antes y después de enriquecimiento, obteniendo solo 1 muestra positiva antes del enriquecimiento, y

2.9 Zonas de unión



47 muestras positivas después del enriquecimiento. Al cultivo bacteriológico sólo 29 fueron positivas, demostrando que el PCR es más sensible que los cultivos bacteriológicos convencionales evaluados. Aunque la sensibilidad de los cultivos bacteriológicos se puede mejorar usando el enriquecimiento secundario retardado, este prolongaría en 5 días el tiempo requerido para el aislamiento de *Salmonella spp.* en muestras ambientales, resaltando aún más la rapidez del PCR (Cohen *et al.*, 1994).

La técnica de PCR ha sido aplicada sobre diferentes tipos de muestras en la industria avícola. Por ejemplo, harina de pluma hidrolizada, harinas de carne, paja y vísceras, han sido inoculadas experimentalmente con un número conocido de *S. typhimurium* (10^6 ufc), luego cultivadas en caldo Selenito-Cistina y Tetracionato antes de realizar el PCR. El fragmento de ADN esperado, correspondiente a la amplificación de los genes *invA* e *invE*, se obtuvo desde todas las muestras inoculadas con *S. typhimurium*. Esto demuestra que ninguno de los medios de enriquecimiento utilizados son inhibitorios para el PCR, presentando una mayor eficiencia el caldo de Tetracionato, por lo tanto, esta técnica puede ser acoplada con cultivos en caldo de enriquecimiento (Schrank *et al.*, 2001). Además, en el mismo estudio, se comparó la sensibilidad de detección de *S. enteritidis* usando métodos bacteriológicos estándares versus la detección por PCR. Para ello, 24 pollitas de 1 día se infectaron experimentalmente con 0,1 ml de caldo de enriquecimiento que contenía 4×10^3 ufc de *S. enteritidis*. Posteriormente 12 aves fueron sacrificadas a las 48 h y el resto de las 12 aves fueron sacrificadas 7 días post inoculación. Posteriormente se hizo el diagnóstico a partir de tonsilas cecales y vísceras. A las 48 h post inoculación fue posible detectar *S. enteritidis* por PCR en 9 de las 12 muestras analizadas (75 %), mientras que sólo 3 de las 12 muestras (25 %) fueron positivas por cultivos bacteriológicos. A los 7 días post inoculación, las muestras positivas a PCR y al cultivo bacteriológico, fueron 11/12 (91,6 %) y 9/12 (75 %), respectivamente, lo que confirmó la mayor sensibilidad del PCR en comparación con los métodos bacteriológicos estándares (Schrank *et al.*, 2001).

Whyte *et al.*, (2002), compararon el PCR con el cultivo bacteriológico estándar, en la detección de *Salmonella* a partir de muestras de piel de pollo naturalmente infectadas, obteniendo como resultados 32 (16 %) y 38 (19 %) de muestras positivas a *Salmonella*, para cultivo bacteriológico y PCR, respectivamente, demostrando la mayor sensibilidad del PCR en la detección de muestras positivas en comparación con el cultivo bacteriológico estándar.

b.1) PCR de tiempo real.

Recientes avances en la tecnología del PCR, han permitido la aparición de termocicladores de tiempo real. En estos termocicladores, la reacción de amplificación se realiza en capilares de vidrio y la detección del producto PCR la efectúa un detector de fluorescencia incorporado al termociclador, en cada ciclo de amplificación, reduciendo los tiempos de realización de la prueba desde 5 horas a 20-30 minutos (Anón, 1998).

Con esta tecnología, las temperaturas de incubación son logradas a través de la utilización de aire termoregulado, el cual al poseer una baja masa, permite que el proceso de enfriamiento y calentamiento que se realiza dentro de la cámara termal, se realice más rápidamente, comparado con los antiguos equipos de PCR, siendo la tasa de transición de temperatura en promedio de 20 °C/ segundo (Anón, 1998).

La reacción de amplificación se lleva a cabo en capilares de vidrio de borosilicato, los cuales pueden contener entre 5-20 µl de muestra. Estos capilares tienen una alta relación superficie-volumen, lo que permite que un ciclo de PCR se complete en menos de 30 segundos. Entonces, un PCR completo de 30-40 ciclos puede desarrollarse en 20-30 minutos (Anón, 1998).

Lightcycler PCR de tiempo real (Roche): Uno de los aspectos más importantes del *Lightcycler PCR* (Roche), es la posibilidad de ir monitoreando ciclo

por ciclo la formación de producto PCR. La cantidad de producto del PCR aumenta en forma logarítmica en los primeros ciclos, antes de llegar a un “*plateau*”. Es así, como un monitoreo ciclo por ciclo, permite identificar el ciclo en la cual la formación de producto PCR entra en su fase logarítmica, es decir, cuando la cantidad de ADN se duplica por cada ciclo. En esta fase, la señal de fluorescencia es distinguible fácilmente de la señal “*background*”, entregando información precisa acerca de la concentración inicial de la secuencia blanco (Anón, 1998).

- **Detección del fragmento de ADN amplificado:** La detección del producto amplificado por el *Lightcycler PCR* de tiempo real puede realizarse por dos vías:

- 1) Una alternativa es agregar a la reacción de PCR el fluorocromo SYBR Green I, el cual es capaz de intercalarse en el ADN doble hebra, incrementando significativamente su fluorescencia, siendo la señal fluorescente proporcional a la cantidad de ADN. Al final de la etapa de elongación, todo el ADN se encuentra como hebra doble, por lo que es en esta fase donde existe la mayor cantidad de fluorocromo SYBR Green I intercalado. La fluorescencia es detectada al final de la fase de elongación, en el canal 1 (F1) de 530 nm del equipo *Lightcycler PCR* (Anón, 1998) (Figura 2).

El problema de este procedimiento es que el SYBR Green I se intercala en cualquier ADN de hebra doble presente en la reacción, por lo que no es un procedimiento de detección muy específico (Anón, 1998).

- 2) La otra alternativa que existe para la detección del producto amplificado es el uso de dos oligonucleótidos específicos (sondas) complementarios al fragmento de ADN amplificado, marcados con diferentes fluorocromos. Una de las sondas está marcada en su extremo 3' con un fluorocromo dador (usualmente fluoresceína), mientras que la otra sonda, adyacente a la primera, está marcada en su extremo 5' con un fluorocromo aceptor (LC-RED 640). La transferencia de

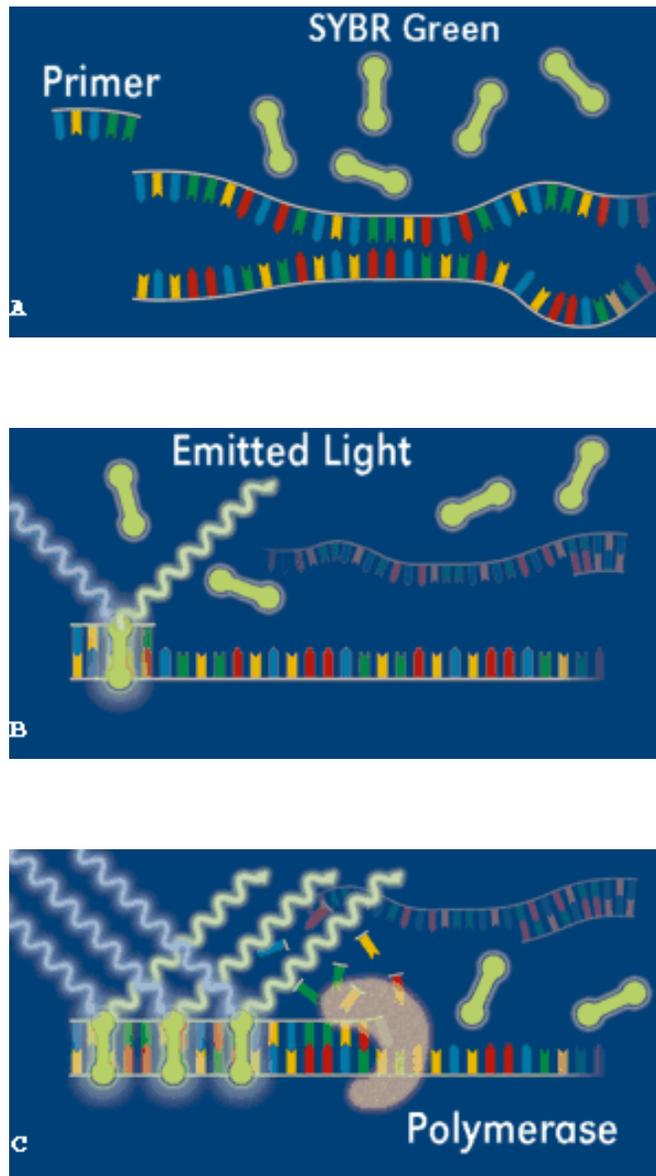


Figura 2. Detección del producto amplificado mediante el fluorocromo SYBR Green I.

A) El ADN se encuentra como hebra simple después de la fase de la denaturación. En esta etapa de la reacción, el fluorocromo SYBR Green I no se puede intercalar y la intensidad de señal fluorescente es baja. **B)** Durante la fase de alineación, los primers se unen a la secuencia blanco, resultando en pequeñas partes de ADN doble hebra, donde el fluorocromo SYBR Green I se puede intercalar, aumentando la señal fluorescente. **C)** Durante la fase de elongación, más y más cantidad de fluorocromo se intercala en la nueva molécula de ADN doble hebra. Si la reacción es monitoreada continuamente, un incremento en la fluorescencia se puede visualizar en tiempo real.

energía fluorescente (FRET) solo ocurrirá cuando las dos sondas se unan al ADN en cercana proximidad (1-5 nucleótidos). El fluorocromo dador es excitado por una fuente de luz externa y emite una radiación (FRET) que es absorbida por el fluorocromo aceptor. Este último a su vez, emite una radiación de diferente longitud, la que es filtrada y detectada por el lector del equipo. La cantidad de FRET es proporcional a la cantidad de producto de ADN, por lo tanto, la señal aumenta después de cada ciclo. La fluorescencia es detectada al final de la fase de alineación, en el canal 2 (F2) de 640 nm del equipo *Lightcycler PCR* (Caplin *et al.*, 1999) (Figura 3 y 4).

En un estudio con el *Lightcycler PCR* de tiempo real (Roche), se comparó la detección de *Salmonella spp.* con los métodos bacteriológicos estándares. Se utilizaron los partidores para la amplificación del gen *invA* de *Salmonella spp.*, y el formato SYBR Green I para la detección del producto amplificado. Para ello, fueron analizadas 492 muestras de intestinos y 27 tómulas cloacales obtenidas de 47 galpones de aves, previo enriquecimiento en caldo Tetrionato. De la totalidad de las muestras intestinales, 62 (12,6 %) y 32 (6,5 %) fueron positivas a *Salmonella* mediante PCR tiempo real y cultivo bacteriológico, respectivamente. De las 27 muestras de tómulas cloacales, 3 (11,1 %) fueron positivas a *Salmonella* mediante los dos métodos. Los resultados obtenidos por PCR en un tiempo total menor a 24 h (18 h de enriquecimiento y 25-30 min de PCR) permitió comprobar la gran sensibilidad del PCR tiempo real (6 ufc/ml), adicionado a un previo enriquecimiento en caldo Tetrionato, versus los métodos bacteriológicos (Eyigor *et al.*, 2002).

Kurowski *et al.*, (2002), implementaron una técnica diagnóstica para la detección de *Salmonella spp.* a partir de muestras fecales de bovinos, equinos y caninos, que se correlaciona correctamente con los resultados obtenidos mediante el cultivo bacteriológico estándar. La prueba consistió en 16-20 h de enriquecimiento en caldo Tetrionato, el uso de un kit comercial para realizar la extracción de ADN, seguido de 2 h de PCR tiempo real. Se utilizaron los partidores

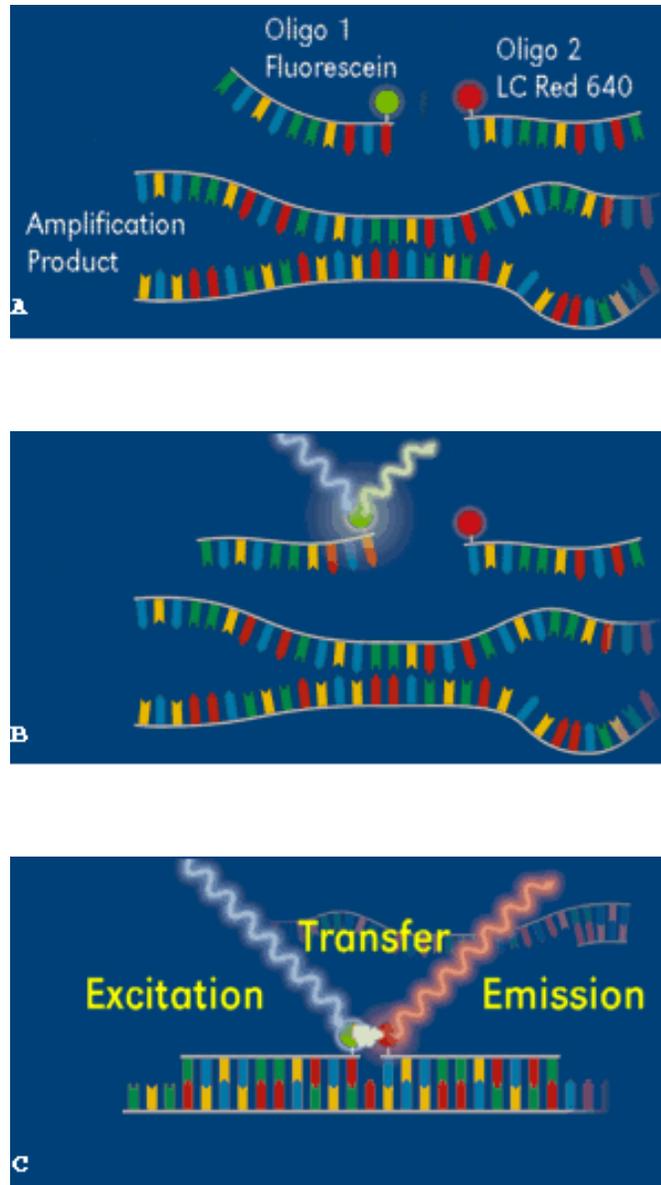


Figura 3. Detección del producto amplificado mediante sondas de oligonucleótidos. **A)** Componentes esenciales para realizar la detección: dos sondas de oligonucleótidos marcadas, el oligo 1 marcada con fluoresceína (fluorocromo dador) en su extremo 3', mientras que el oligo 2 esta marcada con LC Red 640 (fluorocromo aceptor) en su extremo 5', y el producto amplificado. **B)** Durante la fase de denaturación, no se produce la unión de las sondas de oligonucleótidos, por lo tanto la señal fluorescente es baja. **C)** Las sondas se unen al ADN amplificado, quedando en cercana proximidad. El fluorocromo dador es excitado por una fuente de luz externa y emite una radiación (FRET) que es absorbida por el fluorocromo aceptor. La intensidad de la luz emitida por el fluorocromo aceptor es registrado en el canal 2 al final de la fase de alineación, donde la intensidad es máxima.

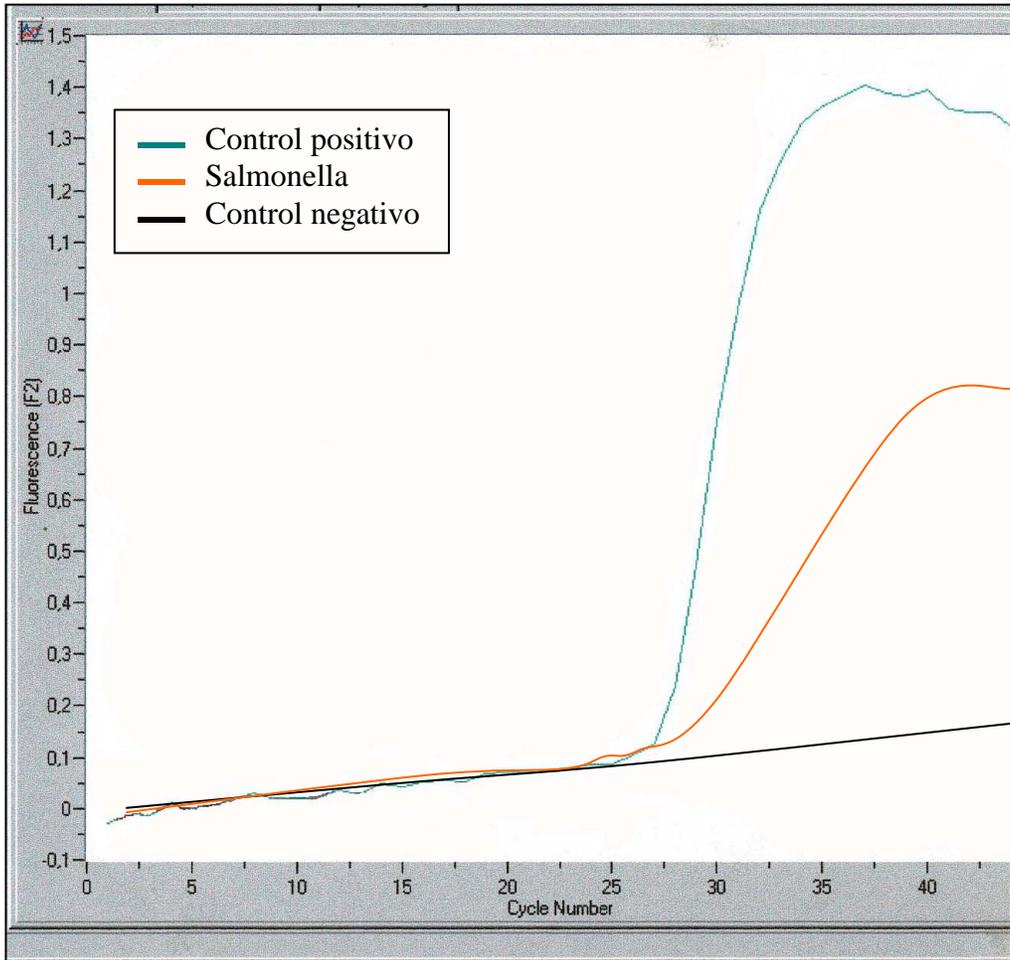


Figura 4. Amplificación y detección de ADN de *Salmonella* en canal 2 (F2) de 640 nm del equipo Lightcycler PCR.

para la detección del gen *spaQ* de *Salmonella spp.* y el formato de sondas fluorescentes para la detección del producto amplificado. La prueba de PCR de tiempo real obtuvo una sensibilidad y especificidad relativa de 100 % y 98,2 %, respectivamente, comparado con el cultivo bacteriológico estándar, teniendo además un límite de detección de 10^3 ufc/ml de caldo de enriquecimiento Luria-Bertani.

Eyigor y Carli (2003), desarrollaron una prueba de PCR tiempo real con sondas fluorescentes para detectar el gen *invA* de *Salmonella spp.* a partir de heces de aves y de canales de pollo, mostrando una sensibilidad de 3 unidades formadoras de colonia y una especificidad del 100 %, determinado a través de la utilización de diluciones de moléculas de ADN en cultivos puros. Se analizaron 147 muestras de intestinos, 72 tórculas cloacales y 50 muestras de canales (cuello de aves). De la totalidad de las muestras intestinales, 13 (8,8 %) y 25 (17 %) fueron positivas a *Salmonella* mediante el diagnóstico bacteriológico y PCR tiempo real, respectivamente. De las 50 muestras de canales, 45 (90 %) fueron positivas a *Salmonella* mediante los dos métodos. No se detectó *Salmonella* a partir de las muestras de las tórculas cloacales en ambos métodos. En total se analizaron 249 muestras, con un 58 (23,3 %) y 70 (28,1 %) de las muestras positivas a *Salmonella* mediante cultivo bacteriológico y PCR tiempo real, respectivamente (Eyigor y Carli, 2003).

- **Curva de “Melting”** : El termociclador *Lightcycler PCR* (Roche), además es capaz de detectar la especificidad del producto amplificado, a través del análisis de la curva de “Melting” que se realiza una vez finalizado el PCR.

Todo ADN tiene una temperatura de “Melting” (T_m), la cual es definida como la temperatura en la cual el 50 % del ADN se encuentra como hebra simple, y el otro 50 % se mantiene como hebra doble. El parámetro más importante que determina la T_m del ADN es la secuencia nucleotídica, siendo lo más importante el tamaño y la cantidad de guanina-citosina (GC) que contiene ese fragmento. El

sistema *Lightcycler PCR* tiene la ventaja de que este procedimiento puede ser realizado en el mismo capilar cerrado usado para la amplificación sin la necesidad de abrirlo, evitando así posibles contaminaciones (Anón, 1998).

La curva "*Melting*" se obtiene al final del PCR. Para ello, el ADN de los capilares se desnatura a través de un rápido calentamiento a 95 °C, seguido de un enfriamiento a 55 °C. Posteriormente, los capilares se calientan lentamente hasta los 95 °C, midiéndose la fluorescencia emitida por el ADN cada 0,2 °C. El análisis de la curva de "*Melting*" permite la confirmación e identificación del producto PCR, como además, la diferenciación del producto PCR específico de aquellos no específicos (dímeros partidores), que se producen cuando hay poco o no existe templado de ADN, o cuando existe un mal diseño de los partidores. También, permite descartar una posible contaminación de la muestra analizada con el ADN proveniente del control positivo (Anón, 1998).

- **"*Crossing point*":** Indica el n^o de ciclo en el cual la reacción de amplificación entra en su fase logarítmica. Identificar este ciclo, permite cuantificar la concentración inicial de la secuencia blanco. El "*crossing point*" es calculado por medio de un programa que se encuentra incorporado al equipo *Lightcycler PCR*, el cual identifica, mediante una línea de base en el gráfico fluorescencia vs ciclo, el ciclo en la cual la señal fluorescente es capaz de distinguirse de la señal background para cada cantidad de molécula blanco. Luego, el "*crossing point*" correspondiente es medido, y el software calcula una curva estándar mediante un gráfico número de ciclo vs concentración logarítmica. Es así, como las muestras en estudio se extrapolan con esta curva estándar, permitiendo calcular la concentración inicial de la molécula blanco (Anón, 1998).

- **Kit del *Lightcycler PCR* para la detección de *Salmonella spp.* (ROCHE):** Este kit está diseñado para su uso en diferentes matrices alimentarias, tales como frutas y vegetales; alimentos altamente carbohidratados como pastas; alimentos altamente proteicos; aceites y grasas; té, café, bebidas, carnes, quesos, pescado,

chocolate y cocoa, pudiendo detectar *Salmonella spp.* a una concentración de 10^3 ufc/ml de caldo de enriquecimiento (agua peptonada fosfatada, Rappaport-Vassiliadis, Tetracionato) (Veliz, 2002)¹. Sin embargo, no hay antecedentes de su efectividad en la detección de *Salmonella spp.* en muestras no alimentarias.

El kit contiene los partidores que permiten amplificar la zona del ADN que codifica para el gen del 16s ARN de *Salmonella spp.*, las sondas de oligonucleótidos que permiten la detección del producto amplificado, premezclas de reactivos necesarios para la reacción (*FastStart Taq* ADN polimerasa, mezcla dNTP, solución amortiguadora), y el control positivo.

2.10 Situación en Chile.

En la actualidad, Chile, cuenta con una ventajosa situación zoonosanitaria, constituyendo un valioso patrimonio nacional que es cautelado rigurosamente por la autoridad sanitaria y los diferentes sectores privados involucrados en la elaboración de productos pecuarios.

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), institución perteneciente al Ministerio de Agricultura, es la entidad oficial encargada de la inspección y fiscalización de toda la cadena productiva de la industria avícola, garantizando la elaboración de productos sanos e inocuos, tanto para el mercado nacional como internacional. Para esto cuenta con un moderno laboratorio de estándar internacional para diagnóstico pecuario, con unidades de alto nivel tecnológico.

Dadas las altas exigencias, tanto de los mercados nacionales como internacionales, para llevar a cabo su acción fiscalizadora, el SAG necesita tecnologías rápidas de diagnóstico. Esto permitiría la toma de decisiones y soluciones rápidas para el control de la *Salmonella*, considerada tanto de importancia nacional e internacional, disminuir los costos de almacenamiento del

¹ Veliz, Guido. TM. 2002. [Comunicación personal]. Laboratorio Roche Chile S.A.

producto acabado y de las materias primas, y obtener un aumento de la productividad. Esto último se refiere a la mayor automatización de estas tecnologías que permiten una menor manipulación y elevan el número de muestras a analizar.

El uso de la tecnología del *Lightcycler PCR* de tiempo real es una técnica promisoría que se usa en Chile en diferentes laboratorios, permitiendo la detección de *Salmonella spp.* en diferentes muestras de alimentos, pero no hay antecedentes de su uso en productos de la industria avícola.

La utilización del *Lightcycler PCR* de tiempo real para la detección de *Salmonella spp.* en productos de la industria avícola, representaría un gran beneficio para la función fiscalizadora del SAG, aumentando la capacidad diagnóstica y eficiencia en la respuesta tanto para los periodos normales como en los casos de emergencia, reduciendo los tiempos y costos que implica la utilización del cultivo bacteriológico estándar en la detección de *Salmonella spp.* en la industria avícola.

La implementación de esta técnica constituiría un aporte a la inocuidad de nuestra producción avícola en el ámbito nacional e internacional, ayudando a cumplir las altas exigencias sanitarias de los mercados internacionales.

En vista de las grandes ventajas que posee el PCR de tiempo real con respecto a los métodos bacteriológicos estándares en la detección de *Salmonella spp.*, en esta memoria de título se comparó el uso del PCR de tiempo real, utilizando el *Lightcycler PCR* con el kit de detección de *Salmonella spp.* de Roche desarrollado originalmente para su uso en muestras alimentarias, con el cultivo bacteriológico estándar, en la detección de *Salmonella* en muestras clínicas, habitualmente remitidas por la industria avícola (piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo) al SAG.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general

Comparar técnicas de diagnóstico de *Salmonella spp.* en matrices no alimentarias.

3.2 Objetivos específicos

Comparar la técnica de PCR tiempo real con el cultivo bacteriológico estándar en la detección de *S. typhimurium* en piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo inoculadas experimentalmente.

4. MATERIALES Y MÉTODO.

4.1 Normas de bioseguridad en el laboratorio: Para prevenir una posible contaminación con *S. typhimurium*, se utilizó delantal, guantes desechables sin polvo, mascarillas, alcohol yodado para desinfección de las manos y del mesón de trabajo. El material de desecho se esterilizó en autoclave a 121 °C por 30 minutos, eliminando así toda fuente de infección. Para la preparación de los reactivos de la reacción de PCR se trabajó en un gabinete de bioseguridad tipo 1.

4.2 Muestras: Para el desarrollo de la parte experimental se utilizaron los dos tipos de muestras que oficialmente son remitidas, desde las plantas faenadoras, al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para realizar el aislamiento rutinario de *Salmonella spp*:

- **Piel de cuello:** un “pool” de 900 g de piel de cuello de pollo fueron gentilmente donadas por la Dra. Irma Acevedo, Laboratorio Bacteriología, SAG. El pool se homogeneizó en seco con el equipo “Masticator” (IUL Instruments, España), para luego separarlos en grupos de 60 g y cada grupo en porciones de 5 g. A una de estas alicuotas de 5 g se le realizó un aislamiento bacteriológico estándar previo para determinar la ausencia de *Salmonella spp*. y el resto se almacenó a 5 °C hasta su posterior procesamiento.

- **Agua de lavado:** para obtener este tipo de muestra, se utilizaron 5 pollos enteros faenados; siguiéndose las recomendaciones oficiales del SAG. Cada uno de ellos se colocaron en bolsas plásticas, donde se les añadieron 400 ml de agua peptonada fosfatada; luego de agitar 25 veces de arriba para abajo las bolsas plásticas, se retiró el agua de lavado y se alicuotaron en volúmenes de 15 ml. A una de estas alicuotas de 15 ml se le realizó un aislamiento bacteriológico estándar para determinar la ausencia de *Salmonella spp*. y el resto se almacenó a 5 °C hasta su posterior procesamiento.

Para un nivel de confianza de 95 %, un error α de un 5 %, y una diferencia de eficiencia de 0,09, se calculó un total de 132 reacciones de PCR para piel de cuello y 132 PCR para agua de lavado de canales de pollos, con sus respectivos aislamientos bacteriológicos.

4.3 Inoculación experimental con *S. typhimurium*.

4.3.1 *S. typhimurium* usada en la inoculación experimental.

Para realizar la inoculación experimental de las muestras, se utilizó la bacteria *S. typhimurium* marcada con genes de resistencia para ácido nalidíxico y rifampicina, facilitada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, U. de Chile. Esta bacteria se mantuvo refrigerada a 5 °C en tubos de agar común semitendido. Para su reactivación y multiplicación, se realizó un inóculo de la bacteria en caldo común, el cual se incubó a 37 °C por 18 h. La concentración bacteriana se determinó por comparación con el nefelómetro de McFarland (tubo N° 1) y se verificó mediante determinación de ufc en agar XLD (Difco®) con ácido nalidíxico y rifampicina (20 mg/ml, Laboratorio Chile).

4.3.2 Inoculación experimental de las muestras.

- **Piel de cuello:** cada alicuota de 5 g de piel de cuello de pollo se inoculó con 5 ml de una suspensión de 10^5 ufc/ml de *S. typhimurium*. Una vez inoculadas, las alicuotas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 40 ml de agua peptonada fosfatada, obteniéndose una concentración final de bacterias de 10^4 ufc/ml. Inmediatamente, las muestras fueron trituradas y homogeneizadas por 3 minutos con el equipo “Masticator” (IUL Instruments, España).

De cada bolsa se procedió a realizar la determinación de *S. typhimurium* por el cultivo bacteriológico estándar y mediante la técnica de PCR tiempo real.

- **Agua de lavado:** cada alicuota de 15 ml de agua de lavado se inoculó con 5 ml de una suspensión de 10^5 ufc/ml de *S. typhimurium*. Una vez inoculadas, las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 30 ml de agua peptonada fosfatada, hasta tener una concentración final de bacterias de 10^4 ufc/ml. Inmediatamente, las muestras fueron homogeneizadas por 1 minuto con el equipo “Masticator” (IUL Instruments, España).

De cada bolsa se procedió a realizar la determinación de *S. typhimurium* por el cultivo bacteriológico estándar y mediante la técnica de PCR tiempo real.

4.4 Determinación de *Salmonella* por aislamiento bacteriológico.

Con las muestras ya inoculadas se procedió inmediatamente a realizar el cultivo bacteriológico mediante la siembra de 30 μ l del homogeneizado con asa calibrada en placas de agar XLD (Difco®), suplementado con ácido nalidíxico y rifampicina (20 mg/ml de cada antibiótico).

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó una inspección de las placas para identificar colonias de *Salmonella* (colonia transparente con centro negro) (Figura 5).

4.5 Determinación de *Salmonella* por PCR tiempo real.

Paralelamente al aislamiento bacteriológico, se transfirieron 2 ml de cada homogeneizado a tubos eppendorf, los cuales se almacenaron a 5 °C, para luego realizar la determinación de *Salmonella* por PCR. Se utilizó la metodología descrita por el kit *Lightcycler PCR para Salmonella spp.* según instrucciones del proveedor (Roche).

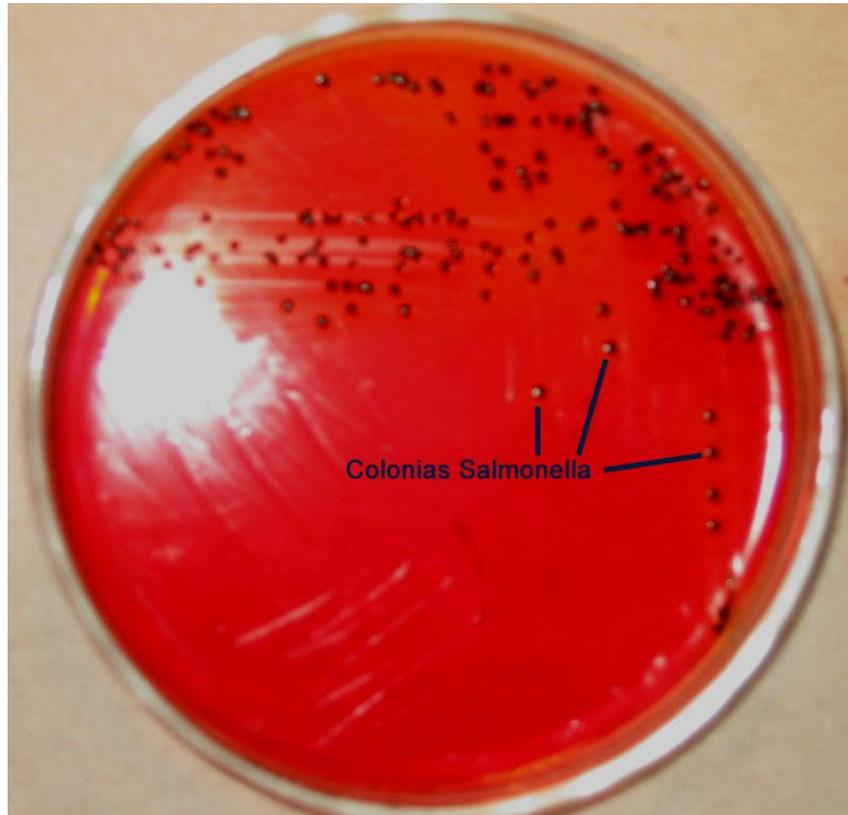


Figura 5. Colonias de *S. typhimurium* marcada con genes de resistencia a ácido nalidíxico y rifampicina (colonia transparente con centro negro) aisladas en placas de agar XLD.

a) Extracción del ADN

El kit de extracción elaborado por laboratorios Roche (*Salmonella Shortprep* kit), incluye 96 tubos eppendorf, con 200 μ l de reactivo de lisis cada uno.

Se agitaron los tubos eppendorf que contenían el homogeneizado por 2 segundos, y se dejaron reposar por 5-10 minutos a temperatura ambiente. Luego se transfirieron 50 μ l de sobrenadante a los tubos del kit que contienen 200 μ l de reactivos de lisis, se agitaron por 2 segundos y luego se incubaron en un termobloque por 10 minutos a 95 °C-100 °C. Posteriormente, los tubos se sacaron del termobloque, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto, luego se agitaron por 2 segundos y se centrifugaron a 8.000 x g durante un minuto a temperatura ambiente. El ADN presente en el sobrenadante se utilizó inmediatamente para la realización de la amplificación en la reacción de PCR.

b) Amplificación del ADN

Se utilizó la técnica de PCR de tiempo real con sondas fluorescentes. El kit de detección de *Salmonella* para *Lightcycler PCR* proporciona los reactivos necesarios para realizar la amplificación y detección de la secuencia específica blanco (Tabla 1).

Se ocuparon 15 μ l de Mezcla Master de PCR (Tabla 2), que incluye el control interno en la muestra. Luego de agregar 15 μ l de Mezcla Master a un capilar de vidrio, se agregó 1 μ l de ADN extraído anteriormente con el kit de extracción, y 4 μ l de H₂O hasta completar los 20 μ l de reacción, para finalmente sellar el capilar. En paralelo se amplificó un control negativo y un control positivo, suministrado por el kit. Los capilares se centrifugaron a 700 x g por 5 segundos (3.000 rpm), y luego se colocaron en el termociclador para su amplificación. Para asegurar una máxima confiabilidad en la reacción de PCR, cada reacción de amplificación tiene un control interno, suministrado por el kit, para detectar

TABLA 1. Contenidos del kit de amplificación “*Lightcycler Salmonella detection kit*”.

Tubo/Tapa	Rótulo	Contenido/función
1	Mezcla de detección de <i>Salmonella</i> para <i>Lightcycler</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • 3 x 64 µl (10x) • Para amplificación y detección de la secuencia específica de <i>Salmonella</i>. • mezcla con partidores y sondas hibridadoras específicas para <i>Salmonella</i> ADN y para el control interno. • Partidores específicos para <i>Salmonella</i>. • sonda hibridadora 1: fluorocromo <i>Lightcycler Red 640</i> en su extremo 5' y fosforilada en su extremo 3'. • sonda hibridadora 2: fluorocromo <i>Lightcycler Red 705</i> en su extremo 5' y fosforilada en su extremo 3'. • Sonda hibridadora 3 y 4: fluorocromo <i>Lightcycler fluoresceína</i> en su extremo 3'. • Control interno: plasmidio de ADN con sitios de unión para los partidores que se unen a la secuencia blanco de <i>Salmonella</i> y con sitios de unión específicos para las sondas hibridadoras 2 y 3.
2	Solución enzimática para detección de <i>Salmonella</i> por <i>Lightcycler</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 3 x 64 ul • Mezcla de reacción para PCR (después de la combinación de los contenidos del tubo 2 y 3). • Contiene <i>FastStart Taq</i> ADN polimerasa, solución amortiguadora, y mezcla dNTP (con dUTP en vez de dTTP).
3	Mezcla de reacción para detección de <i>Salmonella</i> por <i>Lightcycler</i>	
4	Control positivo para detección de <i>Salmonella</i> para <i>Lightcycler</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x 50 ul • contiene solución estabilizada de un ADN plasmidial con la secuencia blanco de <i>Salmonella</i> para usarse como control positivo en el PCR.
5	H ₂ O para PCR	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x 1 ml • Agua para la dilución de la mezcla de reacción y para usarse como control negativo de <i>Salmonella</i>.
6	Uracil-DNA glicosilasa, termolábil, 1 U/ul	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x 96 ul • Uracil DNA glicosilasa para prevención de contaminación por <i>carry-over</i>.

TABLA 2. Volúmenes indicados para la preparación de la mezcla Master basados en una reacción individual estándar de 20 μ l.

Componente	Volumen
H ₂ O para PCR (tubo 5)	10 μ l
Mezcla de detección de <i>Salmonella</i> para <i>Lightcycler</i> . (tubo 1)	2 μ l
Mezcla enzimática Master para detección de <i>Salmonella</i> para <i>Lightcycler</i> 10 x conc. (tubos 2 y 3 combinados)	2 μ l
Uracil-DNA glicosilasa, termolábil, 1 U/ μ l (Tubo 6)	1 μ l
Volumen total Mezcla Master	15 μl

inhibiciones en la amplificación, detectando los resultados falsos negativos. El control interno está diseñado para ser amplificado con los mismos partidores utilizados para el ADN de *Salmonella*. Sólo una región específica de unión para la sonda LC-RED 705 diferencia al control interno de la secuencia específica blanco. Es así, que la fluorescencia emitida por el control interno se detectó en el canal 3.

El protocolo de amplificación incluye una incubación inicial a 37 °C por 2 minutos para que actúe la enzima Uracil-DNA glicosilasa. Posteriormente se realizó una desnaturalización inicial del ADN e inactivación de la enzima a 95 °C por 10 minutos. Luego se realizaron 45 ciclos de amplificación, con los siguientes pasos: desnaturalización a 95 °C por 1 segundo, alineación a 59 °C por 30 seg, y elongación a 72 °C por 5 segundos. La fluorescencia de cada muestra fue medida automáticamente en el canal 2 (F2), que registra la longitud de onda de 640 nm, automáticamente al final de cada etapa de alineación de los partidores al ADN de *Salmonella*.

Se utilizaron los partidores suministrados con el kit y que amplifican la zona 16s ARN.

4.6 Determinación de especificidad de la reacción de PCR.

La especificidad de la reacción de PCR se determinó a través del análisis de la **Curva de "Melting"** del ADN obtenido después de la amplificación. Para ello, el ADN de los capilares se desnaturalizó a través de un rápido calentamiento a 95 °C seguido de enfriamiento a 45 °C. Posteriormente, los capilares se calentaron lentamente hasta los 75 °C, midiéndose la fluorescencia emitida por el ADN cada 0,2 °C. El análisis del patrón de la curva de temperatura "Melting", permitió diferenciar el producto específico de aquellos no específicos, o una posible contaminación con el ADN del control positivo.

4.7 Análisis de resultados.

Para determinar si ambas técnicas presentan diferencias significativas, se utilizó la prueba de Mc Nemar, que se basa en la aplicación de la fórmula de chi-cuadrado en relación únicamente a las casillas de la tabla de 2x2 que representan cambios. Su ecuación es:

$$X^2 = \frac{(B - C)^2}{B + C}$$

El contraste se hace por la tabla de chi-cuadrado para un grado de libertad.

5. RESULTADOS.

5.1 Piel de cuello de pollo.

Las muestras de piel de cuello de pollo se analizaron mediante cultivo bacteriológico estándar y PCR de tiempo real. De un total de 132 muestras analizadas por PCR de tiempo real, 46 muestras (34,8 %) fueron positivas y 86 muestras (65,2 %) fueron negativas. De las 132 muestras analizadas por cultivo bacteriológico estándar las 132 muestras fueron positivas (Tabla 3).

Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística de Mc Nemar (Dawson-Saunders y Trapp, 1997), para evaluar la asociación existente entre el diagnóstico mediante el cultivo bacteriológico estándar y el PCR de tiempo real, observándose una diferencia significativa entre ambas técnicas diagnósticas $\chi^2 = 86$ ($p < 0,05$), siendo la proporción de positivos para el cultivo bacteriológico significativamente más alta que la proporción de positivos para el PCR de tiempo real.

TABLA 3. Detección de *S. typhimurium* inoculada experimentalmente en piel de cuello de pollo mediante el cultivo bacteriológico estándar y PCR de tiempo real.

	PCR Tiempo Real	Cultivo Bacteriológico
POSITIVO	46 (34,8 %)	132 (100 %)
NEGATIVO	86* (65,2 %)*	0 (0 %)
TOTAL	132 (100 %)	132 (100 %)

* 4 muestras F3 negativos

5.2 Agua de lavado de canales de pollo.

Las muestras de agua de lavado de pollo se analizaron mediante cultivo bacteriológico estándar y PCR de tiempo real. De un total de 132 muestras analizadas por PCR de tiempo real, 116 muestras (87,9 %) fueron positivas y 16 muestras (12,1%) fueron negativas. Al analizar las 132 muestras por cultivo bacteriológico estándar todas las muestras resultaron positivas (Tabla 4).

Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística de Mc Nemar (Dawson-Saunders y Trapp, 1997), para evaluar la asociación existente entre el diagnóstico mediante el cultivo bacteriológico estándar y el PCR de tiempo real, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambas técnicas diagnósticas $\chi^2 = 16$ ($p < 0,05$), siendo la proporción de positivos para el cultivo bacteriológico significativamente más alta que la proporción de positivos para el PCR de tiempo real.

TABLA 4. Detección de *S. typhimurium* inoculada experimentalmente en agua de lavado de canales de pollo mediante el cultivo bacteriológico estándar y PCR de tiempo real.

	PCR Tiempo Real	Cultivo Bacteriológico
POSITIVO	116 (87,9 %)	132 (100 %)
NEGATIVO	16 (12,1%)	0 (0 %)
TOTAL	132 (100 %)	132 (100%)

5.3 Especificidad del producto de PCR.

La especificidad del fragmento de ADN obtenido luego de la amplificación por PCR de la cepa *S. typhimurium*, ocupada para la inoculación experimental de las muestras de pollos, se determinó a través de la Curva de "Melting",

obteniéndose un patrón totalmente diferente al que tiene el control positivo aportado por el kit. Esto permitió detectar en las muestras la presencia de una amplificación específica de *S. typhimurium*, y descartar amplificaciones no específicas o una posible contaminación con el control positivo (Figura 6).

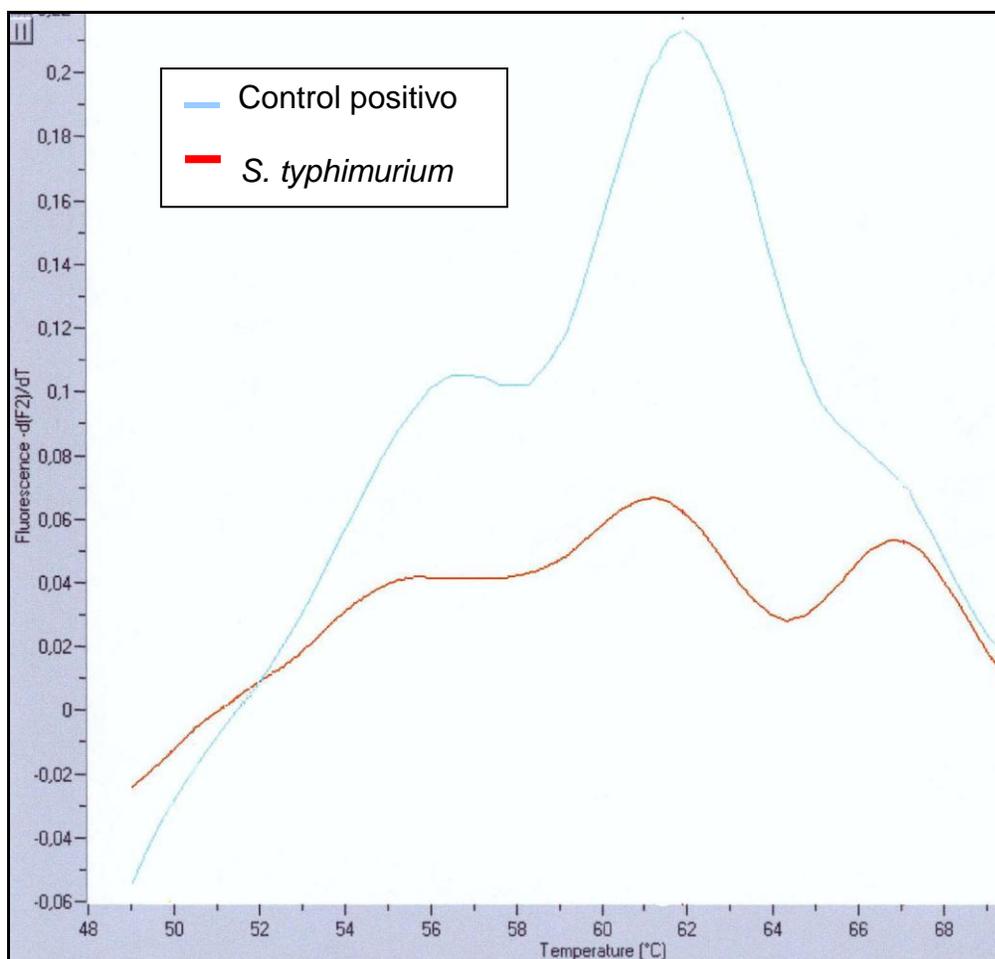


Figura 6. Curva de “Melting”. La curva del Control positivo y *S. typhimurium* presentan un patrón diferente y característico, permitiendo determinar la especificidad del producto PCR.

5.4 Tiempo de ejecución del PCR de tiempo real y del cultivo bacteriológico estándar.

La utilización del PCR de tiempo real disminuyó considerablemente los tiempo de detección de *S. typhimurium*. en ambos tipos de muestras analizadas. El tiempo total utilizado para realizar la extracción, amplificación y determinación de la especificidad del producto PCR fue de 1 h y 25 minutos, mientras que el tiempo requerido para obtener resultados positivos mediante el cultivo bacteriológico estándar fue de 24 h.

6. DISCUSIÓN.

Los productos de origen aviar han estado frecuentemente involucrados en la transmisión de *Salmonella spp.*, convirtiéndose en uno de los principales reservorios asociados a brotes de toxiinfecciones alimentarias en el hombre, tanto en Chile como en el mundo (Prado *et al.*, 2002; MMWR, 2003b)

Por esto, la industria avícola tiene que aplicar rutinariamente técnicas de detección de *Salmonella*, para detectar productos contaminados e implementar mejoras en la cadena de producción, evitando con ello las contaminaciones con este enteropatógeno. Para llevar a cabo esto, es deseable que el método de diagnóstico utilizado tenga una alta sensibilidad y especificidad, y se pueda aplicar a un gran número de muestras, con una rápida obtención de los resultados.

Hoy en día, la utilización del cultivo bacteriológico es universalmente reconocido como el método estándar para la detección de bacterias patógenas, como *Salmonella spp.*, en diferentes muestras clínicas, ambientales y alimentarias. Sin embargo, pese a que es un método con buena sensibilidad y especificidad, una de sus principales limitaciones, es que el aislamiento y confirmación de la presencia de *Salmonella spp.* toma alrededor de 4 a 7 días lo que resulta demasiado tiempo y además, laborioso (Murray y Barton, 1987). Por lo tanto, técnicas de diagnóstico más rápidas, pero con sensibilidad y especificidad semejantes o más sensibles, son necesarias para la detección de *Salmonella spp.* en la industria avícola.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es probablemente una de las herramientas diagnósticas más poderosas disponibles hoy en día, debido a su elevada sensibilidad y las perspectivas futuras de una realización más simple y automatizada. La técnica de PCR se ha aplicado para la detección de distintos serotipos de *Salmonella*, desde muestras clínicas, ambientales y de alimentos (Cohen *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 1994; Aabo *et al.*, 1995; Whyte *et al.*, 2002),

pudiendo detectar a la bacteria de forma más rápida (24-30 h) y en algunos casos, con una sensibilidad mayor que el cultivo bacteriológico estándar. Esto se explica principalmente por la incapacidad de los cultivos de detectar células no viables o dañadas; a la presencia de microorganismos contaminantes que pueden inhibir el desarrollo de *Salmonella*; al uso de antibióticos en los animales infectados, que pueden retardar el crecimiento de la bacteria; o por la eliminación periódica y en bajo número de *Salmonella*, particularmente en los individuos portadores (Stone *et al.*, 1994).

Recientes avances en la tecnología del PCR, han permitido el desarrollo de los termocicladores de tiempo real, los que tienen la capacidad de detectar *Salmonella* a tiempos tan cortos como 25 minutos, analizando hasta 32 muestras de aves infectadas simultáneamente (Eyigor *et al.*, 2002; Eyigor y Carli, 2003).

El uso del PCR tiempo real, permite la detección de *Salmonella spp.* unas 10 veces más rápido, e incluso con una mayor sensibilidad y especificidad que aquella mostrada por trabajos donde se ha utilizado el PCR convencional. Así lo demuestra un trabajo realizado por Kurowski *et al.*, (2002), donde usaron el PCR de tiempo real para la detección de *Salmonella spp.* desde muestras fecales, obteniendo una sensibilidad y especificidad de 100 % y 98,2 % respectivamente, comparado con el cultivo bacteriológico. Estos resultados demuestran un importante mejoramiento sobre los resultados obtenidos por Gentry-Weeks *et al.*, (2002), los cuales utilizando el PCR convencional para la detección de los genes *invE-A* ó *hisJ* de *Salmonella*, obtuvieron sensibilidades de 80 y 93,3 %, y una especificidad de 98,6 y 85,6 %, respectivamente, en comparación al cultivo bacteriológico.

Existen pocos trabajos que han utilizado el PCR de tiempo real en la detección de *Salmonella spp.* en muestras clínicas desde pollos (Eyigor *et al.*, 2002; Eyigor y Carli, 2003). En dos trabajos, se demostró la mayor sensibilidad y especificidad del PCR tiempo real, en comparación con el cultivo bacteriológico

estándar. Sin embargo, existen diferencias significativas en la metodología utilizada por estos autores para llevar a cabo la detección de *Salmonella spp.* desde muestras clínicas de pollos, con respecto a la metodología usada en esta memoria de título. Es así como, en ninguno de estos trabajos utilizaron el kit de extracción y amplificación destinados a muestras alimentarias, como fue la utilizada en este trabajo. De hecho, el gen blanco del PCR usado por Eyigor *et al.*, (2002) y Eyigor y Carli (2003) fue el gen *invA* y el gen blanco del kit usado en esta memoria de título fue el gen 16s ARN de *Salmonella spp.* Además, las muestras analizadas tampoco corresponden al tipo de matriz empleada en esta memoria de título (piel y agua de lavado de pollos), y lo más importante tal vez, es que en estos trabajos se utilizaron diluciones de moléculas de ADN en cultivos puros para realizar las pruebas de sensibilidad (Eyigor y Carli, 2003), o bien, se realizó un cultivo de enriquecimiento de la muestra, antes de realizar el PCR (Eyigor *et al.*,2002; Eyigor y Carli, 2003), lo que no se hizo en este trabajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Eyigor y Carli (2003), los cuales desarrollaron una prueba de PCR de tiempo real con sondas específicas, para la detección del gen *invA* de *Salmonella spp.* a partir de intestinos de aves, y de canales (cuello de aves), el PCR de tiempo real presentó una sensibilidad mayor (3 UFC/ml), que aquella presentada por el cultivo bacteriológico estándar; con una especificidad del 100 %, y pudiendo analizar 32 muestras simultáneamente en un menor tiempo (18 h con 25 min), a partir de muestras provenientes de aves naturalmente infectadas, en comparación a los 4-7 días que se demora en aislar *Salmonella* mediante el cultivo bacteriológico estándar.

En otro estudio, Eyigor *et al.*, (2002), realizaron la comparación del PCR tiempo real usando el formato SYBR Green I para la detección del gen *invA* de *Salmonella* con el cultivo bacteriológico. En este trabajo, el PCR de tiempo real también presentó una sensibilidad mayor (6 ufc/ml) que el cultivo bacteriológico estándar; con una especificidad del 100 %, y un tiempo de detección menor (18 h de enriquecimiento selectivo más 25 minutos de PCR tiempo real y el análisis

simultáneo de hasta 32 muestras), que aquella presentada por el cultivo bacteriológico estándar.

En este estudio, al analizar los resultados obtenidos en la detección de *S. typhimurium* inoculadas en piel y agua de lavado de canales de pollos, de un total de 132 muestras analizadas para cada tipo de muestras, 86 (65,15 %) y 16 (12,12 %), respectivamente, fueron negativas al PCR tiempo real, mientras que ninguna muestra resultó negativa al cultivo bacteriológico estándar. Esto explica que al aplicar Mc Nemar a los resultados obtenidos se detectaran diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, se puede decir que el PCR de tiempo real aplicado en esta memoria no es una técnica que entregue resultados equivalentes al cultivo bacteriológico estándar.

En este trabajo, se utilizaron los kit de extracción (*Shortprep Kit*) y detección de ADN de *Salmonella spp.* para *Lightcycler PCR*, los cuales están diseñados por laboratorios Roche para su uso en diferentes matrices exclusivamente alimentarias, tales como frutas y vegetales; alimentos altamente carbohidratados como pastas; alimentos altamente proteicos; aceites y grasas; té, café, bebidas, carnes, quesos, pescado, chocolate y cocoa (Veliz, 2002)¹, pero se desconocía su eficiencia en el tipo de muestras clínicas probadas en esta memoria. La muestra de piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo tienen la importancia de ser el principal tipo de muestras tomadas en los planteles avícolas para la detección de *Salmonella*, de acuerdo a la normativa vigente del SAG.

Nuestros resultados claramente difieren con la eficiencia reportada para esta técnica, con la utilización de estos kit de extracción y detección para el diagnóstico de *Salmonella spp.* mediante la utilización del *Lightcycler PCR* en matrices alimentarias, en donde el uso del PCR tiempo real presentaría una sensibilidad entre 10^3 ufc/ml de caldo de enriquecimiento (Rappaport-Vassiliadis, caldo Tetratonato), a 10^2 ufc/ml de caldo de pre enriquecimiento (agua peptonada

¹ **Veliz, Guido. TM.** 2002. [Comunicación personal]. Laboratorio Roche Chile S.A.

fosfatada) (Veliz, 2002)¹. De acuerdo a lo anterior, a pesar que nuestras muestras contenían una cantidad, suficiente, en teoría, para ser detectada por el PCR tiempo real (10^4 ufc/ml) en muestras alimentarias, un gran número de muestras no pudieron ser detectadas.

Esto indicaría que si bien estos kits funcionan adecuadamente en matrices alimentarias para la detección de *Salmonella*, la utilización de éste en muestras más complejas, como es en este caso la piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo, no sería eficiente.

El uso de muestras con una matriz clínica más compleja, podría explicar la obtención de estos resultados. La utilidad de la reacción de PCR para la detección de microorganismos, está limitada en gran parte por la presencia de sustancias inhibitorias en las complejas muestras biológicas donde se encuentra el microorganismo a detectar, las cuales inhiben o bien reducen la eficiencia de amplificación (Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997). Los inhibidores del PCR pueden actuar por medio de uno o más mecanismos, tales como, a) interferencia en la lisis celular durante el proceso de extracción de ADN, b) degradación o captura de los ácidos nucleicos, ó c) inactivación de la polimerasa termoestable. Aunque se han reportado una gran variedad de inhibidores, la identidad y modos de acción de muchos permanecen inciertas (Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997).

Eyigor y Carli (2003) utilizaron un método de extracción que generó una adecuada lisis celular y extracción de ADN, para su posterior detección mediante PCR tiempo real, obteniendo una eficiencia mayor al del cultivo bacteriológico estándar. En primer lugar, la muestra se incubó 18 h en medio de enriquecimiento selectivo, lo que además de aumentar el nº de bacterias presentes en la muestra, diluyó la cantidad de posibles inhibidores de la muestra. Luego, el método de extracción consistió en un proceso laborioso, donde se realizó una centrifugación por 4 minutos a $4.600 \times g$, lo que permitió la formación de un pellet, conformado principalmente de células bacterianas, y el sobrenadante, que contenía posibles

inhibidores pertenecientes a la muestra fué eliminado. Posteriormente, el pellet se suspendió en solución salina 0,85 % y 20 μ l de agua deionizada, el cual lavó y diluyó los posible inhibidores y protegió a las células bacterianas de una posible lisis celular. Posteriormente, esta suspensión bacteriana se incubó a 95 °C por 10 minutos, produciendo la lisis celular, obteniendo así las moléculas de ADN de *Salmonella* necesarias para su detección mediante PCR tiempo real. Luego, se realizó una última centrifugación por 3 minutos a 18.000 x g, permitiendo obtener un sobrenadante, en el cual se encontraban las moléculas de ADN, y un pellet, donde se encontraban los restos celulares que podrían actuar como posibles inhibidores de la reacción de PCR. Esta mayor cantidad de etapas de centrifugación y lavados con solución salina y agua deionizada, permite obtener moléculas de ADN más limpias y puras, libres de restos celulares, a diferencia del proceso de extracción utilizado en este trabajo, donde sólo se realizó una centrifugación por 1 minuto a 8.000 x g para que los restos celulares sedimenten, y no actúen como posibles inhibidores de la reacción de PCR.

Si bien existen muchos kit comerciales rápidos de extracción que permiten procesar más muestras en un menor tiempo, además de mejorar la eficiencia y la seguridad del laboratorio, están especialmente recomendados para su utilización en muestras relativamente limpias, tales como tejidos de mamíferos, caldos de cultivo y cultivo puros. Experimentos han demostrado que los métodos de extracción con una mayor cantidad de etapas entregan un mayor rendimiento, particularmente en muestras más complejas (Wilson, 1997).

Otro de los elementos a considerar, es que el ácido nucleico obtenido a través de la reacción de lisis celular y purificación del ADN, pudo ser degradado o secuestrado en el proceso de amplificación por diferentes procesos, ya sea físicos, químicos o enzimáticos. Nucleasas pueden entrar a la reacción, ya sea a través de una manipulación descuidada, por la misma muestra analizada, por otras bacterias presentes en la muestra, y en algunos casos, por el mismo organismo blanco. Además, la concentración efectiva de partidores puede ser reducida por la unión

no específica al ADN de bacterias no blanco, asimismo la unión del ADN blanco a sedimentos de las muestras ambientales también pueden explicar la inhibición. Es así como Whyte *et al.*, (2002), si bien pudieron detectar *Salmonella* inoculada experimentalmente en piel de pollo mediante PCR convencional, obtuvieron sensibilidades diferentes: de 10^1 ufc/ml y 10^4 ufc/ml de *S. kentucky*, en muestras de piel de pollo estéril y no estéril, respectivamente. Estas diferencias fueron atribuidas a problemas de inhibición. En este trabajo, no se utilizó piel de pollo estéril, lo que no nos permite descartar la presencia de ADN no blanco que disminuya la concentración de los partidores, o la presencia de algún sedimento que se una al ADN blanco, dejándolo no disponible para la reacción de amplificación.

Mahon *et al.*, (1994), pudieron detectar *Salmonella* mediante PCR convencional, a partir de muestras de piel de pollo, obteniendo resultados más favorables que el cultivo bacteriológico estándar. Esto se explicaría principalmente a que la técnica utilizada correspondió a un PCR múltiple, el cual utiliza dos pares de partidores para la amplificación del ADN de la *Salmonella* blanco, un par para la detección de *Salmonella spp.*, y el otro para la detección de *S. enteritidis* lo que aumenta la sensibilidad de la prueba. Además se realizó una incubación de las muestras en caldo de enriquecimiento por 18 h a 37 °C, lo que aumentó el nº de bacterias presentes en la muestra.

Otra posible explicación de la inhibición de la reacción de amplificación, podría ser la inhibición de la *Taq* polimerasa por la acción de diferentes inhibidores presentes en las muestras, los cuales inhibirían la reacción en cadena de polimerasa por medio de la unión o desnaturalización de la polimerasa (Abu Al-Soud y Radstrom, 1998). Sales biliares y otras sales, restos celulares y otros elementos presentes en las muestras clínicas y en los medios de enriquecimiento de bacterias entéricas pueden causar inhibición de la amplificación, ya sea por efectos físico-químico o enzimáticos (Wilson, 1997).

Una de las grandes ventajas que posee el kit de detección utilizado en esta memoria, es la presencia de un control interno, que ayuda a la interpretación de los resultados falsos negativos. El control interno es un ADN que utiliza los mismos partidores y polimerasa que el ADN blanco para amplificar una zona de él, la que va a ser detectada por el termociclador. Además, el termociclador es capaz de discriminar la fluorescencia emitida por la muestra, de la fluorescencia emitida por el control interno (Anón,1998).

Es así, como en casi la totalidad de las muestras analizadas tanto de piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo, hubo amplificación de los controles internos, descartando con ello la presencia de una sustancia inhibidora que pueda desnaturar o bloquear totalmente a la *Taq* polimerasa, y/o eliminar a otros reactivos de la mezcla, como por ejemplo los partidores. Sólo 4 de las 132 muestras de piel de cuello de pollo presentaron su control interno negativo, lo que podría sugerir la existencia de algo así.

Muchas sustancias presentes en las muestras causan inhibición por uno o varios mecanismos, que no están totalmente entendidos (Wilson, 1997). Se ha observado que la presencia de una gran cantidad de grasas y proteínas en las muestras alimentarias, son causantes de inhibición en la reacción de PCR (Rossen *et al.*, 1992). La piel de pollo, presenta entre sus componentes gran cantidad de grasa. Es así, que el análisis químico proximal en base seca realizado a piel de canales de pollo de 49 días, presentan un promedio de 23,3 % y 74,5 % de proteína cruda y extracto etéreo (grasa), respectivamente (Meléndez, 1992). Debido a que la grasa es uno de los componentes que se encuentra en mayor proporción en la piel de pollo, tal vez esta podría explicar, al menos en parte la inhibición de la reacción de PCR en las muestras de piel de pollo.

Para solucionar la posible inhibición a este nivel, habrían 2 alternativas: 1) llevar a cabo un enriquecimiento por 18-24 h de la muestra, de tal manera de aumentar el número de bacterias y diluir los inhibidores presentes en la muestra, o

bien, 2) utilizar un método de extracción de ADN que permita eliminar la presencia de los inhibidores, como por ejemplo el “*High Pure Salmonella Preparation kit*” (Roche), el cual se recomienda para extracciones de ADN en aquellas matrices de alimento que contengan una gran cantidad de inhibidores. Este método consiste en someter a las muestras analizadas, a una serie de centrifugaciones y de lavados con soluciones amortiguadoras, obteniendo moléculas de ADN más puros. Además, el “kit” incluye la filtración por membrana, reteniendo las moléculas de ADN, y eliminando otros componentes de las muestras. Si bien este método es más laborioso, con una demora aproximadamente de 35 minutos, no representaría un aumento de tiempo tan considerable, tomando en cuenta que utilizando el “*Shortprep kit*”, se obtiene la extracción del ADN blanco en 25 minutos. Además, el PCR de tiempo real presenta una sensibilidad de 10^3 ufc *S. enteritidis* /ml de agua peptonada fosfatada extraídas con el “*High Pure Salmonella Preparation kit*”, en comparación a una sensibilidad de 10^4 ufc *S. enteritidis* /ml de agua peptonada fosfatada extraídas con el “*Shortprep kit*”.

Según la literatura revisada, éste sería el primer trabajo relacionado a la detección de *Salmonella spp.* desde muestras correspondientes al agua de lavado de canales de pollo, mediante PCR convencional o PCR tiempo real. Al analizar nuestros resultados obtenidos en la detección de *S. typhimurium* inoculada experimentalmente en agua de lavado de canales de pollo mediante el PCR de tiempo real, se obtuvo una menor cantidad de muestras negativas (16/132 muestras; 12,1 %) con respecto a la piel de pollo (86/132 muestras; 65,2 %). Esto se puede explicar debido a que, en las muestras correspondientes al agua de lavado de canales de pollo, los posibles inhibidores que se pudieran encontrar, como la grasa, se encuentran más diluídos, minimizando, así, su efecto inhibitor de la amplificación.

De acuerdo a estos resultados, se recomienda usar preferentemente como muestra para el PCR de tiempo real, el agua de lavado de canales de pollo en vez de la piel de pollo, ya que al parecer tendría menos inhibidores para el PCR.

Para concluir, se puede decir que la técnica de PCR tiempo real con sondas específicas para detectar la zona 16s ARN de *S. typhimurium* a partir de piel de cuello y agua de lavado de canales de pollos, donde se utilizaron kits diagnósticos de extracción y detección de ADN para matrices alimentarias, presentó una menor eficiencia de detección que el cultivo bacteriológico estándar. Esta baja eficiencia presentada por la técnica de PCR tiempo real se debería a la presencia de inhibidores en las muestras clínicas analizadas, lo cual produjo una disminución de la sensibilidad de la técnica.

7. CONCLUSIONES.

1. El PCR tiempo real demostró ser una técnica simple y rápida de realizar, que permitió llevar a cabo el análisis de hasta 22 muestras en un tiempo de 1h y 25 min, tiempo significativamente menor al necesario para llevar a cabo el cultivo bacteriológico estándar, que fue de 24 h.
2. El cultivo bacteriológico estándar permitió la detección de un 100 % de las muestras de *Salmonella typhimurium* en ambos tipos de matrices, a diferencia del PCR de tiempo real que sólo detectó el 34,8 % y el 87,9 % de las muestras de *Salmonella typhimurium* en piel de cuello y agua de lavado de canales de pollo, respectivamente.
3. Los resultados obtenidos en esta memoria de título permiten concluir que el ensayo de PCR de tiempo real, llevado a cabo bajo estas condiciones, no es capaz de reemplazar al cultivo bacteriológico estándar.
4. Se sugiere en orden a tener un PCR de tiempo real más eficiente, incorporar al protocolo de procesamiento de las muestras, el cultivo de las muestras por 18 h en medio de enriquecimiento selectivo y/o utilizar un método de extracción de ADN que permita la obtención de un ADN más puro.

8. BIBLIOGRAFÍA.

AABO, S.; ANDERSEN, J. K.; OLSEN, J. E. 1995. Research note: Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. Letters in Applied Microbiology. 21(3): 180-182.

ABU AL-SOUD, W.; RADSTROM, P. 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Applied and Environmental Microbiology. 64(10): 3748-3753.

ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, V.; MARTÍNEZ, M. C.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I. 2000. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Revista médica de Chile. 128(10): 1075-1083.

ÁLVAREZ, D. M; GAMAZO, C.; ECHARRI, N. 1999. Nuevo método de captura de *Salmonella*: la filtración inmunomagnética. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 22 (3): 9-15.

ANÓN. 1998. The Lightcycler™- the smartest innovation for more efficient PCR. Roche Molecular Biochemicals Biochemica. Nº 2:4-7.

ANÓN. 2002. Revisión. Salmonella. [en línea]. < <http://www.cof.es/pam226/revisionsalmonella.htm> > [consulta: 19-4-2003].

BARROW, P. A. 1993. Salmonella control – past, present and future. In: Proceedings Xth World Veterinary Poultry Association Congress, Sidney, Australia. 1993. pp. 55-65.

BLIVET, D.; SOUMET, C.; EMEL, G.; COLIN, P. 1998. Food safety and monitoring of safety aspects: Rapid detection methods for pathogens. In: 3rd Karlsruhe Symposium: European research towards safer and better food review and transfer Congress, Congress Centre, Karlsruhe, Germany. 18-20 October 1998. pp. 1-8.

BRIGMON, R. L; ZAM, S. G; WILSON, H. R. 1995. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with enzyme-linked immunosorbent assay. Poultry Science. 74(7): 1232-1236.

CAPITA, R.; ÁLVAREZ-ASTORGA, M; CALLEJA, C. A.; DEL CAMINO, M.; MORENO, B. 2001. Evaluation of the EF-18 agar-hydrophobic grid membrane

filter (HGMF) method to isolate *Salmonella* from poultry products. The Journal of Microbiology. 39(3): 202-205.

CAPLIN, B. E.; RASMUSSEN, R. P.; BERNARD, P. S.; WITTEW, C. T. 1999. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. Roche Molecular Biochemicals Biochemica. N° 1. 5-8.

CARLONI, G. 1996. Género *Salmonella*. **In:** Stanchi, N. O.; Martino, P. E.; Gentilini, E.; Reinoso, E. H.; Pennimpe, E. Temas de Microbiología Veterinaria. Ediciones Sur. República de Argentina. pp:203-214.

CARRAMINANA, J. J.; YANGUELA, J.; BLANCO, D.; ROTA, C.; AGUSTIN, A. I.; ARINO, A.; HERRERA, A. 1997. *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. (Abstract). Journal of Food Protection. 60: 1312-1317.

CARTER, G. R. 1984. Part 8. Gram negative. Facultatively Anaerobic Rods. **In:** Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 4th ed. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, USA. pp. 92-110.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2002a. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Foodborne infections. [en línea]. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g.htm> [consulta: 16-6-2002].

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2002b. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Salmonellosis. [en línea]. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_t.htm> [consulta: 26-5-2002].

CLOAK, O. M.; DUFFY, G.; SHERIDAN, J. J.; McDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S. 1999. Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid detection of *Salmonella* spp. from meat and poultry. Journal of Applied Microbiology. 86(4): 583-590.

COHEN, N. D.; WALLIS, D. E.; NEIBERGS, H. L.; McGRUDER, E. D.; DeLOACH, J. R.; CORRIER, D. E.; HARGIS, B. M. 1994. Comparison of the polymerase chain reaction using genus-specific oligonucleotide primers and microbiologic culture for the detection of *Salmonella* in drag-swabs from poultry houses. Poultry Science. 73: 1276-1281.

COYLE, M. B.; MORELLO, J. A.; SMITH, B. 1985. Aerobic bacteria. In: Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. Jr.; Shadomy, H. J. Manual of Clinical Microbiology. 4th Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. EUA. pp. 143-413.

DARGATZ, D. A.; WELLS, S. J.; FEDORKA-CRAY, P. J. 1998. The Veterinarian's Role in Diagnosis, Treatment, and Prevention of Multidrug Resistant *Salmonella typhimurium* DT104. [en línea]. <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Shared_Reports/vet10.htm> [consulta: 6-6-2003].

DAVIES, R.; BRESLIN, M. 2001. Environmental Contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in laying flocks. Veterinary Record. 149: 699-704.

DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R. G. 1997. Capitulo 9: Estimación y comparación de proporciones. In: Bioestadística Médica. 2^a ed. El Manual Moderno. Santafé de Bogotá, México. pp: 171-193.

DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. 1995. Introduction to PCR. In: PCR primer, A Laboratory Manual. pp. 1-79.

EBEL, E. D.; DAVID, M. J.; MASON, J. 1992. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in the U.S commercial egg industry: report on a national spent hen survey. (Abstract). Avian Diseases. 36(3): 646-654.

ENTIS, P. BRODSKY, M. H.; SHARPE A. N.; JARVIS G. A. 1982. Rapid detection of *Salmonella* spp. in food by use of the ISO-Grid Hydrophobic Grid Membrane filter. Applied and Environmental Microbiology. 43(2):261-268.

EYIGOR, A.; UNAL, C.; UNAL, C. B. 2002. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. Letters in Applied Microbiology. 34(1): 37-41.

EYIGOR, A.; CARLI, K. T. 2003. Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. Avian Diseases. 47(2): 380-386.

GAST, R. 2000. *Salmonella* infections. In: Diseases of Poultry by B. W. Calnek. Iowa State University Press. Iowa., EEUU. pp. 81-121.

GENTRY-WEEKS, C.; HUTCHESON, H. J.; KIM, L. M.; BOLTE, D.; TRAUB-DARGATZ, J.; MORLEY, P.; POWERS, B.; JESSEN, M. 2002. Identification of two phylogenetically-related organisms from equine and bovine feces using the polymerase chain reaction for detection of *Salmonella* spp. 40:1487-1492.

HALL, R. 2002. Gastroenteritis due to *Salmonella typhimurium* phage type 135a following consumption of raw egg. Communicable Diseases Intelligence. 26(2): 285-287.

HIRSH, P. 1990. Salmonella In: Review of Veterinary Microbiology. Ed. By E. L. Bibersten; Y. C. Zee. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. pp.110-115.

KHAN, M. I.; NGUYEN, A. V. 1995. A *Salmonella*-specific DNA probe and its use in southern hybridization for differentiation of *Salmonella enteritidis*. Avian Diseases. 39(2): 368-374.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R. Jr.; JANDA, W. M.; SOMMERS, H. M.; WINN, W. C. Jr. 1988. The Enterobacteriaceae. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed. J. B Lippincott Company, Philadelphia, USA. pp: 89-157.

KUROWSKI, P. B.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; MORLEY, P. S.; GENTRY-WEEKS, C. R. 2002. Detection of *Salmonella* spp. in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. American Journal of Veterinary Research. 63(9): 1265-1268.

LE MINOR, L. 1984. Genus III. Salmonella. In: Krieg, N.; Holt, J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. U.S.A. Vol 1. pp. 427-446.

LIMAWONGPRANEE, S.; HAYASHIDANI, H.; OKATANI, A. T.; ONO, K.; HIROTA, C.; KANEKO, K.; OGAWA, M. 1999. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. Journal of Veterinary Medical Science. 61(3): 255-259.

MAHON, J.; MURPHY, P. W.; BARROW, J.; BARROW, P. A. 1994. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. Letters in Applied Microbiology. 19: 169-172.

McLLROY, S.; THOMPSON, J. 1997. Control de la Salmonella en Europa. Industria Avícola. 44(2): 22-25.

MEAD, P. S.; SLUTKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 5(5): 607-625.

MELÉNDEZ, R. 1992. Efectos de la dilución nutritiva y cambios en la razón energía / proteína en raciones para broilers: composición química y evaluación organoléptica de la porción comestible de la canal y peso, composición química y análisis histopatológico del hígado. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 65 p.

MMWR. 2000. Outbreaks of *Salmonella* serotype enteritidis infection associated with eating raw or undercooked shell eggs---United States, 1996-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 49(4): 73-79.

MMWR. 2001. Outbreaks of Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* associated with veterinary facilities---Idaho, Minnesota, and Washington, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 50(33): 701-704.

MMWR. 2003a. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Foodborne Illnesses Selected Sites, United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 52(15): 340-343.

MMWR. 2003b. Outbreaks of *Salmonella* serotype enteritidis infection associated with eating shell eggs--- United States, 1999-2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 51(51): 1149-1152.

MURRAY, C. J.; BARTON, M. 1987. Salmonellosis *Bacteriology*. In: Corner, L. A.; Bagust, T. J. (Eds.). *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*. Csiro for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management. East Melbourne. Australia. pp. 3-8.

MURRAY, P. R.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A.; ROSENTHALS, K.S. 1999. Capítulo 24: Enterobacteriaceae. In: *Microbiología Médica* 2^o ed. Harcourt Brace. pp. 227-240.

NAGARAJA, K. V.; POMEROY B. S.; WILLIAMS J. E. 1991. Paratyphoid infections. In: *Diseases of poultry*, 9th ed. Calnek B. W.; Barnes H.J.; Beard C.W.; Reid, W.M.; Yoder, H.W., Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 99-120.

OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS (ODEPA). 2003. Producción de carne: situación actual y perspectivas para 2003. [en línea].

<<http://odepa.gob.cl/noticiasweb/servlet/noticiasweb.NoticiasDet?idcla=2&idn=108>
Z > [consulta: 7-5-2003].

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. 2001. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*. 45(1): 61-69.

PADRON, M. 1990. *Salmonella typhimurium* outbreak in broiler chicken flocks in Mexico. (Abstract). *Avian Diseases*. 34(1): 221-223.

PEPLOW, M. O.; CORREA-PRISANT, M.; STEBBINS, M. E.; JONES, F.; DAVIES, P. 1999. Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3):1055-1060.

POPPOF, M. Y.; LE MINOR, L. 1992. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7^o rev. Paris: W.H.O. Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. pp. 465-468.

PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, I. M.; ARELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MAMANI, N.; FUENTES, D.; O'RYAN, M.; MUÑOZ, V. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Período 1999-2000. *Revista médica de Chile*. 130(5): 495-501.

RIGBY, C. E. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolysaccharide in poultry specimens. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(6): 1327-1330.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; RASMUSSEN, O. E. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. (Abstract). 17(1): 37-45.

ROY, P.; DHILLON, A. S.; LAUERMAN, LI. H.; SCHABERG, D. M; BANDLI, D.; JOHNSON, S. 2002. Results of *Salmonella* isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristic. *Avian Diseases*. 46: 17-24.

SCHINKINGER, M. 2003. Detection of *Salmonella* with the impedance method. [en línea]. <http://www.sylab.com/downloads/evaluate0102_en.pdf> [consulta:22-10-2003].

SCHRANK, I. S.; MORES, M. A. Z.; COSTA, J. L. A.; FRAZZON, A. P. G; SONCINI, R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SILVA, S. C. 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Veterinary Microbiology*. 82: 45-53.

STONE, G. G; OBERST R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. 1994. Detection of *Salmonella* Serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (7): 1742-1749.

TORO, H.; SAUCEDO, C.; BORIE, C.; GOUGH, R. E.; ALCAINO, H. 1999. Status of free-living Pigeons in the city of Santiago. *Avian Pathology*. 28: 619-623.

VAN DE GIESSEN, A. W.; PETERS, R.; BERKERS, P. A.; JANSEN, W. H; NOTERMANS, S. H. 1991. *Salmonella* contamination of poultry flocks in The Netherlands. (Abstract). *Veterinary Quarterly*. 13(1): 41-46.

WALTMAN, W. D.; HORNE, A. M; PIRKLE, C. 1993. Influence of enrichment incubation time on the isolation of *Salmonella*. *Avian Diseases*. 37: 884-887.

WHO. 1993. WHO consultation on control of *Salmonella* infections in animals: prevention of foodborne Salmonella infections in humans. WHO/CDS/VPH/93.129, World Health Organization. Jena, Germany.

WHO. 1997. Fact Sheet N° 139: Multidrug Resistant *Salmonella typhimurium*. [en línea]. <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact139.html>>[consulta: 6-6-2003].

WHYTE, P.; Mc GILL, K.; COLLINS, J. D.; GORMLEY, E. 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Veterinary Microbiology*. 89(1): 53-60.

WILLIAMS, A.; DAVIES, A. C.; WILSON, J.; MARSH, D.; LEACH, S; HUMPHREY, T. J. 1998. Contamination of the contents of intact eggs by *Salmonella typhimurium* DT104. *Veterinary Record*. 143: 562-563.

WILSON, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9): 3741-3751.

WRAY, C.; DAVIES, R. H. 1994. Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella enteritidis*. Report of a WHO consultation on strategies for detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks. WHO/ZOON/94.173. World Health Organization. Graz, Austria. 50p.

WYATT, G. M.; LEE, H. A.; DIONYSIOU, S.; MORGAN, M. R.; STOKELY, D. J.; AL-HAJJL, A. H; RICHARDS, J.; SILLIS, A. J.; JONES, P. H. 1996. Comparison of a microtitration plate ELISA with a standard cultural procedure for the detection of *Salmonella spp.* in chicken. *Journal of Food Protection*. 59(3). 238-243.

YAMANE, Y; LEONARD, J. D; KOBATAKE, R; AWAMURA, N; TOYOTA, Y.; OHTA, H.; OTSUKI, K; INOUE, T. 2000. A case study on *Salmonella enteritidis* (SE) origin at three egg-laying farms and its control with an *S. Enteritidis* bacterin. *Avian Diseases*. 44: 519-526.

ZDRAGAS, A.; TSAKOS, P.; MAVROGENT, P. 2000. Evaluation of two assays, MSR/V and RV, for the isolation of *Salmonella spp.* from wastewater samples and broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology*. 31(4): 328-331.

ZHAO, C.; GE, B.; DE VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G; WAGNER, D.; MENG, J. 2001. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D. C., area. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12): 5431-5436.