



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



USO DE REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA EN EL
DIAGNÓSTICO DE *Salmonella* Enteritidis EN TEJIDOS Y CONTENIDO
INTESTINAL DE POLLOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.

PILAR SÁNCHEZ PEREIRA

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

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE

2007



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

USO DE REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA EN EL
DIAGNÓSTICO DE *Salmonella* Enteritidis EN TEJIDOS Y CONTENIDO
INTESTINAL DE POLLOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.

PILAR SÁNCHEZ PEREIRA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. CARLOS NAVARRO
PROFESOR CONSEJERO : DRA. CONSUELO BORIE
PROFESOR CONSEJERO : DR. MARCOS GALLEGUILLOS

SANTIAGO, CHILE
2007

DEDICATORIA

Quisiera dedicar esta Memoria de Título a todas las personas que conforman mi familia, pero principalmente a mis padres, Leonardo Sánchez y Alejandra Pereira los cuales me han apoyado incondicionalmente siempre con cariño y paciencia en cada nuevo proyecto y aventura en los que me he embarcado. Gracias por darme la tranquilidad de poder dedicarme en forma exclusiva a mi trabajo universitario, y espero que siempre estén felices y orgullosos de lo que he logrado. También se la dedico a mis dos abuelitas, Gigi y Zuni, las cuales si bien ya no están, me enseñaron el valor de la alegría, la paciencia y el trabajo cada una a su propia manera. Finalmente me la dedico A MI, por todo el esfuerzo, trabajo, estudio y dedicación que significaron mis años en la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quisiera agradecer a mi profesor guía Carlos Navarro, por haber tomado el riesgo de aceptarme como su primera alumna tesista. Gracias por la simpatía, el apoyo y la paciencia, y por todo lo que me enseñó a lo largo del camino.

Agradezco también a la Dra. Consuelo Borie, por haberme ofrecido este tema de tesis que me encantó desde el principio, y por la confianza, la simpatía, y los consejos que siempre lograron mejorar esta memoria de Título. A la Dra. María Antonieta Jara y Dra. María Luisa Sánchez por celebrar mis chistes aunque algunos fuesen malos, y por que siempre me entregaron alegría y apoyo en lo que fuese necesario.

A todas las personas que trabajan en el laboratorio de microbiología, Pato, Don Humberto y Carlos, que siempre tuvieron la mejor disposición para ayudarme con los materiales necesarios para realizar la parte práctica de este trabajo.

Quiero agradecer a toda mi familia, primos, tíos y demáses, por siempre estar pendientes de una u otra de manera de mi avance en la vida universitaria, y en especial a mis hermanos Carolina y Leonardo los cuales siempre me hicieron reír, hasta en los momentos de más trabajo, y me dieron ánimo y compañía, junto a mi Nana que siempre me ha cuidado, me malcría y me entrega cariño. No puedo olvidar a mi perro Damián, que desde su vida canina, alegra mi vida humana.

Finalmente agradezco a todos mis grandes amigos. A mis partners de Universidad Rocío, Aída, Lily y Raúl por su apoyo incondicional, y también a mis amigos que siempre estuvieron conmigo desde los distintos caminos que han tomado, Osa, Nacha, Bernie, Marién y tantos otros. Por último están mis fabulosos amigos a la distancia Aránzazu, Agustín, Cynthia, Leticia, Carolina, Bruno, Lucas, María, Yanys, Yashin y muchos más que siempre han logrado hacer mi vida más hermosa y luminosa. ¡¡¡GRACIAS A TODOS!!!

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	ÍNDICE DE CONTENIDOS	
II.	ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS	
III.	RESUMEN	
IV.	SUMMARY	
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	3
2.1	Enfermedades Transmitidas por alimentos	3
2.2	Nomenclatura y clasificación taxonómica de las bacterias del género <i>Salmonella</i>.	4
2.3	Situación mundial y nacional de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	5
2.4	Patogénesis y Epidemiología de <i>Salmonella</i> Enteritidis en aves.	7
2.5	Control y prevención de <i>Salmonella</i> Enteritidis en planteles de aves y en el hombre	10
2.6	Técnicas diagnósticas utilizadas para detectar <i>Salmonella</i> spp en productos avícolas.	12
2.6.1	Técnica de diagnóstico tradicional de <i>Salmonella</i> spp por cultivo bacteriológico.	13
2.6.2	Técnicas de diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp no convencionales.	16
2.6.2.1	<i>Método convencional modificado.</i>	18
2.6.2.2	<i>Método de la Impedancia.</i>	20
2.6.6.3	<i>Técnicas Inmunológicas.</i>	21
2.6.2.4	<i>Técnicas de detección de ácidos nucleicos.</i>	23
2.6.3	Utilización de PCR convencional y cultivo bacteriológico para la detección de <i>Salmonella</i> spp en muestras de la industria avícola.	33
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo General.	35
3.2	Objetivos específicos.	35

4.	MATERIALES Y MÉTODO.	36
4.1	Diseño	36
4.2	ETAPA 1: Establecer la técnica de PCR convencional para la detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	36
4.2.1	Implementación PCR convencional para la detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	36
4.2.1.1	<i>Procedimiento</i>	37
4.2.2	Determinación de la concentración bacteriana mínima detectable por la prueba.	40
4.3	ETAPA 2: Detectar <i>Salmonella</i> Enteritidis en muestras de tejidos de pollos experimentalmente infectados, mediante PCR convencional	40
4.3.1	Detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>nal^r rif^r</i> en tejidos de pollos experimentalmente infectados, positivos al cultivo bacteriológico.	41
4.3.2	Detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>nal^r rif^r</i> , en tejidos de pollos experimentalmente infectados, negativos al cultivo bacteriológico.	41
4.4	Normas de Bioseguridad en el Laboratorio.	41
5.	RESULTADOS	42
5.1	ETAPA 1: Establecer la técnica de PCR convencional para la detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	42
5.1.1	Implementación PCR convencional para la detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	42
5.1.2	Determinación de la concentración bacteriana mínima detectable por la prueba.	43
5.2	ETAPA 2: Detectar <i>Salmonella</i> Enteritidis en muestras de tejidos de pollos experimentalmente infectados, mediante PCR convencional	44
5.2.1	Detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>nal^r rif^r</i> en tejidos de pollos experimentalmente infectados, positivos al cultivo bacteriológico.	44

5.2.2	Detección de <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>nal^r rif^r</i> , en tejidos de pollos experimentalmente infectados, negativos al cultivo bacteriológico.	44
6.	DISCUSIÓN	45
7.	CONCLUSIONES	59
8.	BIBLIOGRAFÍA	60
9.	ANEXOS	68

II. ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

TABLAS

Tabla1	Contenidos del Kit “2X PCR Master Mix (Fermentas®)	38
Tabla 2	Detección de S.E, en tejidos de pollos experimentalmente infectados negativos al cultivo bacteriológico, según muestra	44

FIGURAS

Figura 1	Implementación PCR convencional.	42
Figura 2	Determinación de la concentración mínima detectable por la prueba de PCR	43

III. RESUMEN

Salmonella Enteritidis (S.E) es el serotipo de *Salmonella* más involucrado en la presentación de enfermedades transmitidas por los alimentos en nuestro país, siendo los productos de la industria avícola la mayor fuente de infección para el hombre. Por esta razón, su diagnóstico y control se hace cada vez más importante en los productos de esta industria para evitar brotes que pongan en riesgo la salud de la población.

El cultivo bacteriológico es la prueba diagnóstica tradicional para la detección de S.E en muestras de tejidos de animales, que a pesar de tener una sensibilidad y especificidad apropiada, presenta la gran limitante de tomar como mínimo 4 a 7 días para entregar resultados.

Con el fin de reducir el tiempo de diagnóstico, sin disminuir la especificidad y sensibilidad, es que se han desarrollado metodologías alternativas, entre las cuales el PCR ha ocupado un lugar privilegiado, logrando reducir los tiempos de detección y procesar una gran cantidad de muestras en forma simultánea.

El objetivo de este trabajo fue implementar la prueba de PCR convencional, para la detección de S.E, utilizando partidores específicos para detectar el gen *invA*, y un tratamiento de muestras que incluyó la incubación de éstas en caldo Rappaport Vassiliadis 37°C por 48 horas y un complejo proceso de extracción de ADN bacteriano, para evitar la acción de inhibidores.

Para esto, se realizó una primera etapa en que se implementó la técnica, utilizando bacterias inoculadas en caldo de enriquecimiento, para luego establecer la cantidad de bacterias mínima detectable por la prueba, obteniéndose un mínimo de 10^1 UFC/ml. No se obtuvo bandas de amplificación con cepas de *E. coli* y *Proteus* spp. El caldo Rapapport Vassiliadis no evidenció la presencia de inhibidores ni tampoco los tejidos intestinales, ni órganos internos.

Posteriormente se utilizó la prueba implementada para detectar S.E en 53 muestras de tejidos y contenido intestinal de pollos experimentalmente infectados, positivas al cultivo bacteriológico y en 126 muestras negativas. En el primer caso, todas las muestras presentaron amplificación del gen *invA*, mientras que en el segundo, de las 126 muestras negativas, sólo 6 fueron positivas a PCR (4,8%), correspondiendo 3 de ellas a un pool de órganos y 3 a intestino y contenido intestinal.

Basado en estos resultados, se puede concluir que se logró implementar la prueba de PCR convencional para la detección de S.E en tejidos y contenido intestinal de pollos en forma exitosa, con una alta capacidad de detección bacteriana y con un tiempo de ejecución de un máximo de 3 días (de los cuales 2 corresponden a incubación en caldo de enriquecimiento), la cual debiese ser utilizada como complemento a la prueba tradicional actualmente utilizada.

IV. SUMMARY

Salmonella Enteritidis (S.E) is the most involved *Salmonella* serotype in the presentation of Food-borne Illness in our country, being poultry products the main source of infection for humans. For this reason its diagnostic and control becomes more and more important in the products of this industry, in order to avoid outbreaks that jeopardize public health.

Bacteriological culture is the standard method used for the detection of S.E in animal tissues samples, which although has an appropriate sensitivity and specificity, takes at least 4 to 7 days to deliver results.

In order to reduce diagnostic times, without reduce sensitivity and specificity, new and alternative methodologies have been developed and PCR has taken a privileged place obtaining an important reduction of detection times and processing a great number of samples simultaneously.

The objective of this work was to implement standard PCR test for the detection of S.E by using specific primers to detect *invA* gene, and a sample treatment that included incubation in Rappaport Vassiliadis broth at 37°C for 48 hours and a complex DNA extraction method, to avoid inhibitors action.

For this purpose, a first stage was performed in which the PCR technique was implemented using enrichment broth inoculated whit bacteria, followed by the establishment of the minimal detectable bacterial concentration that the technique was able to detect, obtaining a minimum of 10^1 CFU/ml. The test didn't obtain amplification bands with *E. coli* and *Proteus* spp strains. Rappaport Vassiliadis didn't evidence inhibitors presence; neither did intestinal tissues or internal organs.

After that, the implemented test was used to detect S.E in 53 samples of tissues and intestinal content of experimentally infected chickens that were positive to bacteriological

culture, and 126 negatives samples. In the first case all the samples presented *invA* gene amplification, while in the second experience from the 126 negative samples, only 6 obtained amplification bands (4,8%), being 3 of them a pool of organs, and 3 intestine and intestinal content.

Based in these results, it can be concluded that the implementation of standard PCR test for the detection of S.E in tissues and intestinal content samples from chickens was successful, with a high bacterial detection capacity and an execution time of 3 days, maximum (being 2 of them incubation un enrichment broth). This diagnostic test should be used as a complement for the traditional technique presently used.

1. INTRODUCCIÓN.

En Chile y en el mundo, la ocurrencia de enfermedades causadas por bacterias patógenas presentes en los alimentos aún es alta, a pesar de que esta industria está cada vez más mecanizada y avanza constantemente en la búsqueda de nuevos sistemas para disminuir la contaminación de los productos alimenticios.

Uno de los patógenos que aún se mantiene como causa de una gran cantidad de enfermedades causadas por alimentos es *Salmonella* spp la cual es transmitida al hombre a través del consumo de carne de diversos animales, huevos y productos de aves, entre otras.

Entre las industrias más afectadas por esta bacteria está la avícola, ya que sus productos y subproductos tienen alto riesgo de contaminación, lo cual representa un peligro potencial a la salud de la población humana.

Por este motivo, la industria avícola está en una constante búsqueda de *Salmonella* en todos sus productos, para así poder controlar y conocer el nivel de contaminación que cada uno de ellos tiene. El método convencional para detectar *Salmonella* en los tejidos de los animales infectados es el aislamiento en medios enriquecidos y selectivos, seguido de análisis serológico y bioquímico. Estos métodos tradicionales tienen la dificultad de ser lentos, ya que demandan aproximadamente entre 4 a 7 días y además no permiten procesar un gran número de muestras a la vez.

Debido a ésto, es necesario el uso de métodos de detección primarios de *Salmonella* más rápidos y simples, con los que se pueda procesar un gran número de muestras al mismo tiempo, con alta sensibilidad y especificidad, y a bajo costo. No menos importante es la entrega de resultados, que debe ser rápida y fácil de interpretar.

En el último tiempo han comenzado a usarse métodos de genética molecular tendientes a amplificar zonas específicas del ADN, entre ellos la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *Salmonella* en distintos productos y muestras

provenientes de la industria avícola, como son heces, harina de carne y de pluma hidrolizada, vísceras, paja, entre otros. Dicha técnica permite un diagnóstico más rápido y sobretodo de alta especificidad.

Este trabajo pretende implementar la técnica de PCR estándar para la detección de *Salmonella* Enteritidis en muestras de pollos, de modo de obtener un método más rápido, específico y sensible, que sea complementario a las técnicas de cultivo convencionales actualmente utilizadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen una gran preocupación para la salud pública, pero además repercuten en actividades importantes en la economía de los países, como por ejemplo, la exportación de alimentos. Esto obliga a las autoridades a tomar medidas rigurosas en cuanto al control de la calidad e inocuidad de los alimentos.

Las ETAs son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminadas con agentes biológicos, químicos y físicos en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor en forma individual o colectiva (González y Rojas, 2005). Hasta la fecha se han descrito más de 250 agentes causales de ETA, entre los que se encuentran bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales (Mead *et al.*, 1999; González y Rojas, 2005). Sin embargo, el agente causal más frecuente de ETA son los microorganismos bacterianos (CDC, 2002).

Entre los años 1993 y 2002 en los países de América Latina y el Caribe, se produjeron 6.476 brotes de ETA en humanos, que provocaron 231.888 casos y 318 muertos (PANALIMENTOS, 2002). Por otra parte, en Estados Unidos de Norte América (EE.UU.) el año 2004 se reportaron 251 brotes de ETAs con 16.051 casos en total. Es importante recalcar que este estudio se realizó en 10 estados, que representan a 44,5 millones de personas aproximadamente. Los patógenos bacterianos con mayor incidencia fueron *Salmonella* (14,61/100.000 habitantes) *Campylobacter* (12,78/100.000 habitantes) y *Shigella* (5,06/100.000 habitantes) (CDC, 2006).

En Chile, entre los años 1994 y 2000, el Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA) inició una vigilancia epidemiológica de los brotes de ETAs en el país, en colaboración con el Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y pudieron constatar un aumento en las incidencias de las ETAs. En

el año 1994 se obtuvo cifras de 86 brotes por año, mientras que en el año 2000 éstos ya alcanzaban los 260 por año (Prado *et al.*, 2002).

En los brotes ocurridos durante el año 2000, en 174 de ellos (67%) no se identificó el agente causal, debido a que en la mayoría de las ocasiones no se pudo obtener muestras de los alimentos ni de los pacientes. En 48 brotes (18,5%) en que el estudio microbiológico fue positivo, los microorganismos aislados en forma más frecuente fueron *Salmonella* spp no Typhi (21/48) y *Staphylococcus aureus* (13/48). Los alimentos de mayor riesgo, fueron los productos cárneos (aves, bovinos, cerdos, cecinas) (16,2%) y los platos preparados calientes (15,4%) (Prado *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista económico, las infecciones por *Salmonella* spp, son unas de las más importantes para la industria de los alimentos, en especial, para la industria avícola en la que la pérdida no se produce solamente por mortalidad de las aves, sino que también por el bajo rendimiento productivo de las aves sobrevivientes, las cuales quedan débiles y con alta probabilidad de adquirir una nueva enfermedad (Nagaraja *et al.*, 1991). Tan importante como esto último, son los riesgos y costos para la salud pública. En EE.UU. se estimó que los costos económicos por ETAs causadas por *Salmonella* spp fueron de 2,9 billones de dólares, por concepto de tratamiento de enfermedades, muerte prematura, y ausencia laboral (ERS, 2003).

2.2 Nomenclatura y clasificación taxonómica de las bacterias del género *Salmonella*.

Las bacterias del género *Salmonella*, responsables de la Salmonelosis, son en su mayoría, bacilos móviles pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

La nomenclatura para *Salmonella* está evolucionando hasta el día de hoy, provocando debate en la comunidad científica. La clasificación taxonómica más ampliamente usada es la propuesta por Le Minor y Poppof (1992) en la que se reconocen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *S. entérica* se subdivide en 6 subespecies, que son

enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica (Poppof y Le Minor, 1992). A su vez, dentro de las subespecies, se reconocen distintos serotipos, los cuales hasta el año 2000 alcanzaban a 2400 aproximadamente (Brenner *et al.*, 2000). Esta serotipificación, siguiendo el esquema de Kauffmann-White, se hace a partir de los antígenos somáticos (O) y flagelar H1 y H2 (Poppof y Le Minor, 1992).

Dentro de un mismo serotipo, además, existen bacterias diferentes según su afinidad por un bacteriófago, las cuales se agrupan en fagotipos. Por ejemplo, en el caso de *Salmonella* Enteritidis, se han identificado varios fagotipos, siendo los más asociados a enfermedad en el hombre en Europa y Chile, el 1 y 4 (Prats *et al.*, 2001).

2.3 Situación Mundial y Nacional de *Salmonella* Enteritidis

Salmonella Enteritidis (*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis) es uno de los serotipos más comunes de *Salmonella* en el mundo y particularmente en los países desarrollados. La industria avícola es la más afectada por esta bacteria, afectando principalmente a pollos menores de 21 días, causándoles un cuadro gastroentérico con diarrea, que los puede llevar a una pérdida de peso importante, mala conversión alimenticia e incluso a la muerte. Por otra parte, si bien las gallinas adultas suelen no presentar síntomas, se convierten en portadoras sanas, que contaminan los huevos, dando lugar a pollitos infectados (Nagaraja *et al.*, 1991).

Desde el punto de vista de la salud pública, *Salmonella* Enteritidis, es una zoonosis que es transmitida al hombre a través del consumo de carnes de aves y principalmente huevos (Patrick *et al.*, 2004), causando una enterocolitis de aproximadamente 8 días de duración, pero que no provoca mortalidad (Fica *et al.*, 2001).

En la década del 80 *Salmonella enteritidis* emergió como una importante causa de enfermedad humana. En EE.UU. el año 1985, se estimó una tasa de 2,4 casos por cada 100.000 habitantes, siendo las zonas noreste y oeste las más afectadas. Así mismo, el

número de brotes de enfermedades causadas por *Salmonella* Enteritidis alcanzaron a 81 el año 1989. Debido a esto, a mediados de la década del 90 se iniciaron programas de control y prevención que incluyeron cambios dentro de la industria avícola y educación para los consumidores, logrando reducir la tasa de infección a 1,98 casos por cada 100.000 personas y el número de brotes a 44 el año 1999 (Patrick *et al.*, 2004). Finalmente, el sumario anual del sistema de vigilancia de *Salmonella* de EE.UU. del año 2004, reportó 36.661 aislados de *Salmonella* en los laboratorios de salud pública de ese país, de los cuales el 75% correspondían a *Salmonella* Enteritidis (CDC, 2004).

Por otra parte, en la Unión Europea, el año 1998 hubo 47.875 casos de *Salmonella* Enteritidis diagnosticados, lo cual representó un 13% menos que el año 1997 en que se diagnosticaron 55.278. Sin embargo representa un 34,24% más que el año 1995 en que se aislaron 31.482 casos. Los motivos del aumento de los casos de salmonelosis causada por *Salmonella* Enteritidis en los años 97 y 98 con respecto a años pasados, no están bien establecidos, si bien se cree podrían estar relacionados con el aumento de la temperatura en Europa en aquel periodo (Eurosurveillance, 1999).

En Chile, *Salmonella* Enteritidis es un patógeno más bien reciente, el cual aumentó considerablemente luego de que en el país se lograran disminuir las tasas de fiebre tifoidea, causada por *Salmonella Typhi*, desde 500 casos cada 100.000 habitantes el año 1977, hasta 5 casos por cada 100.000 habitantes el año 1997. Una vez controlada la fiebre tifoidea, *Salmonella* Enteritidis emergió abruptamente a mediados de la década de los 90, pasando de cifras de 0,35 casos por cada 100.000 habitantes el año 1993, hasta 5 casos por cada 100.000 habitantes el año 1998 (Fica *et al.*, 2001).

La aparición y estabilización endémica de *Salmonella* Enteritidis, de acuerdo a Fica *et al* (2001) estaría ligada a cambios industriales específicos que han ocurrido en Chile desde los años 80. Entre éstos se encuentra el cambio de la industria avícola desde un perfil artesanal y de pequeña y mediana empresa, a una industria centralizada con grandes empresas que acaparan gran parte del mercado, lo que implica grandes volúmenes de aves compartiendo alimentos, hábitat y microorganismos.

Por otra parte, la tecnificación de la industria, ha reemplazado alimentos naturales por artificiales, que son generados por la trituración de productos como la carne de soya o el pescado, que son mezclados entre ellos y con otros productos, facilitando la diseminación de posibles contaminantes. Además, la gran aglomeración de aves que implica la crianza industrial, conlleva al estrés y facilita la diseminación de patógenos (Fica *et al.*, 2001).

Es por esto que la carne de las aves, y los huevos, son los principales alimentos involucrados en el contagio de *Salmonella* Enteritidis a humanos. Según un informe de Alexandre *et al* (2001) durante el periodo 1998 – 1999 en la Región Metropolitana se determinó 1 huevo infectado por cada 1000 huevos sometidos a diagnóstico, lo cual resulta significativo considerando que el consumo de huevos en esa región supera los 6.000.000 al día en promedio. Además de esto, la contaminación de un huevo, potencialmente puede afectar a muchas personas si es destinado a productos derivados industriales como por ejemplo, mayonesa. Por otra parte, de 1.524 muestras de carne y menudencias de pollos comerciales, 144 (9,44%) resultaron positivas al diagnóstico de *Salmonella* por aislamiento, y el 75% correspondían a *Salmonella* Enteritidis, siendo principalmente las muestras obtenidas en plantas faenadoras y distribuidoras de abarrotes las que resultaron positivas y no tanto las de supermercados.

Por lo tanto *Salmonella* Enteritidis es un problema de la industria avícola tanto nacional como mundial, que requiere especial atención de parte del sector privado y público, el cual debe combatirlo por medio de sistemas de control y prevención adecuados.

2.4 Patogénesis y Epidemiología de *Salmonella* Enteritidis en aves

En las aves, *Salmonella* Enteritidis, junto a otros serotipos, producen una enfermedad conocida como paratífosis, la cual es responsable de una gran cantidad de pérdidas en la industria avícola, tanto por concepto de mortalidad, como por bajo rendimiento productivo (Nagaraja *et al.*, 1991).

En pollos broiler, se presenta en recién nacidos, o antes de las cuatro semanas de vida, con la tasa de mortalidad mayor entre los 7 y 10 días de edad, dependiendo de la virulencia de la cepa bacteriana. La enfermedad se presenta con anorexia, debilidad, deshidratación, emaciación y eventualmente cojera. En las gallinas adultas, en cambio, la infección es generalmente de carácter subclínico y no logra alterar los parámetros reproductivos, aunque en caso de estrés, pueden llegar a aparecer lesiones como salpingitis y salpingo peritonitis. Epidemiológicamente, la no presentación de enfermedad en animales adultos, con frecuencia complica el problema, ya que estas aves actúan como portadoras (Nagaraja *et al.*, 1991; Parra *et al.*, 2002, Velilla *et al.*, 2004).

La bacteria, al entrar en contacto con las aves, coloniza su intestino gracias a su habilidad para multiplicarse en el lumen intestinal y de penetrar las capas de la mucosa luego de adherirse a los receptores del epitelio (Revolledo *et al.*, 2006). Posteriormente y dependiendo del fagotipo, pueden incluso invadir tejidos internos, entre los que se encuentran ovarios, testículos, bazo y corazón (Desmidt *et al.*, 1996). Luego de la colonización y multiplicación en el intestino, la bacteria es eliminada por las heces al medio ambiente, incrementando el número de posibles animales infectados. Una gran parte de las aves infectadas con *Salmonella* spp, se convierten en portadores asintomáticos que contaminan en forma intermitente y silenciosa. Una sola ave portadora dentro de un lote susceptible es capaz de excretar en las heces suficientes salmonelas para contaminar el ambiente y en especial la cama del piso y nidal (Quiroz, 1987; Nagaraja *et al.*, 1991; Revolledo *et al.*, 2006)

La materia fecal, también puede contaminar las carcasas durante el procesamiento del animal en el matadero. Si bien la carne de las aves recién sacrificadas puede no estar contaminada, el tipo de procesamiento llevado a cabo puede influir y causar contaminación de estas carnes con material fecal. El estrés y el hacinamiento, sumado a las condiciones de transporte, pueden producir un aumento de la proliferación de *Salmonella* en el intestino justo antes de la faena (Velilla *et al.*, 2004)

La transmisión por medio de animales que actúan como vectores mecánicos como: palomas, pájaros silvestres, gatos, perros, roedores e incluso el hombre, también es importante de tener en cuenta, ya que *Salmonella* spp es muy resistente a las condiciones medio ambientales y pueden sobrevivir largos períodos de tiempo especialmente en presencia de materia orgánica y humedad. Sobre todo, es importante el papel de los roedores, especialmente en la propagación de la infección entre galpones del mismo plantel, y también en la contaminación de alimentos. (Nagaraja *et al.*, 1991; McIlroy y Thompson, 1997). La transmisión horizontal de la bacteria por medio del aire y partículas de polvo en suspensión también es importante y debe tenerse en cuenta a la hora de llevar a cabo programas de prevención y control (Nagaraja *et al.*, 1991).

Una de las situaciones epidemiológicas más graves, es cuando *Salmonella* Enteritidis coloniza los ovarios de las gallinas y se mantiene allí en forma indefinida. Esto implica que gran cantidad de huevos e hijos de las aves infectadas, estarán a su vez, infectados (Desmidt *et al.*, 1996; Velilla *et al.*, 2004). En el momento de la ovoposición, se produce la penetración de bacterias al interior del huevo a través de los poros de la cáscara, por un proceso de succión debido a la diferencia térmica existente entre el huevo recién puesto y el ambiente. Una vez dentro del huevo, las bacterias se multiplican rápidamente a temperaturas superiores a los 10°C. Si el huevo estaba fertilizado, el pollito se contamina al momento de la eclosión (McIlroy y Thompson, 1997). Este proceso ocurre más frecuentemente en gallinas mayores de 1 año, debido a que los poros de la cáscara son de mayor tamaño (Velilla *et al.*, 2004). Defectos en la estructura de la cáscara, como trizaduras, provocan un nivel de penetración bacteriano aún mayor (Nagaraja *et al.*, 1991).

Dentro del huevo que ha sido contaminado, la cantidad de bacterias que sobrevive a la acción de sustancias inhibidoras propias el huevo, es muy baja, y no es probable que alcance la dosis mínima que produce enfermedad en una persona, que es de 10^6 a 10^8 bacterias (Murray *et al.*, 1999) Sin embargo, si el huevo se deja a temperatura ambiente, la bacteria se multiplicará con gran rapidez, haciendo imposible que las sustancias inhibidoras puedan evitarlo. Esta es, tal vez, la principal fuente de infección de los seres humanos a partir de la industria avícola (McIlroy y Thompson, 1997).

Finalmente, los insumos alimenticios proteicos de origen animal, como la harina de pescado, de hueso y de subproductos de matadero de aves, pueden estar contaminados con *Salmonella* Enteritidis, y de este modo convertirse en una vía de infección que debe ser tomada en cuenta (Quiroz, 1987; McIlroy y Thompson, 1997).

2.5 Control y prevención de *Salmonella* Enteritidis en planteles de aves y en el hombre.

El control y prevención de *Salmonella* Enteritidis en el mundo entero, ha ido tomando cada vez más importancia debido al gran impacto que esta bacteria tiene en la salud pública. Sin embargo, el control es complicado debido a las interrelaciones que existen entre la contaminación ambiental, las plantas productoras y faenadoras de aves, y el hombre (Parra *et al.*, 2002)

Los esfuerzos en el control de *Salmonella* spp en general se concentran en reducir y eliminar la infección, y prevenir la reinfección en tres puntos importantes: 1) Reproducción y crianza; 2) Medio ambiente; 3) Alimento (Nagaraja *et al.*, 1991)

Una de las medidas más importantes consiste en la limpieza profunda y desinfección de los pabellones, así como también el uso de comederos y bebederos en altura que eviten la contaminación fecal. Además de esto, se debe restringir la entrada a los planteles, a personal y equipos que estén autorizados, y hacer obligatorio el uso de botas de goma las cuales puedan ser desinfectadas con pediluvios, reduciendo así la transmisión horizontal entre galpones y planteles. También se debe controlar a los roedores, las aves migratorias y cualquier otro animal que pudiese actuar como vector mecánico (Nagaraja *et al.*, 1991; McIlroy y Thompson, 1997; Gast, 2000). Por otra parte, el medio debiese ser sometido a vigilancia bacteriológica continua, lo mismo que las aves, que además deben ser controladas serológicamente para detectar a aquellas infectadas para eliminarlas del plantel. Hoy en día existen países en que a los criadores de aves se les da una compensación

monetaria por las pérdidas causadas por la eliminación de animales positivos (Nagaraja *et al.*, 1991; Wegener *et al.*, 2003).

Otras medidas destinadas a disminuir la susceptibilidad de las aves a *Salmonella* Enteritidis son el tratamiento con antibióticos, la exclusión competitiva por medio del uso de probióticos y la vacunación (Chambers y Lu, 2002; Oliveira Cardoso *et al.*, 2006). En el caso de los antibióticos, la preocupación por la aparición de microorganismos resistentes es cada vez mayor, por lo que se buscan formas de que su uso sea cada vez menor y menos frecuente (Oliveira Cardoso *et al.*, 2006). Por otra parte, la utilización de bacteriófagos es una alternativa que ha presentado resultados alentadores en el control de *Salmonella* en productos avícolas, la cual es inocua tanto para el medio ambiente, como para el consumidor (Higgins *et al.*, 2005).

Como los alimentos de las aves pueden ser una importante vía de infección, se deben utilizar aquellos debidamente tratados y peleteados, ya que las altas temperaturas utilizadas en el proceso de peletización destruyen las bacterias. Por otra parte, la inclusión de ácidos orgánicos en los alimentos hace que el pH de éstos disminuya, lo cual consigue disminuir el desarrollo de *Salmonella*. Estas dos medidas, hacen que los alimentos sean más seguros, si bien se debe prevenir y controlar la recontaminación durante el almacenamiento y el transporte (Quiroz, 1987; Nagaraja *et al.*, 1991; McIlroy y Thompson, 1997).

En el caso de los huevos, las medidas de control recomendadas son una rápida recolección post postura, y mínimo cuatro veces al día. El huevo debe ser lavado y fumigado inmediatamente después de la recolección, para luego ser enfriados y refrigerados, de modo de evitar la multiplicación bacteriana. La incorporación de cadenas de frío posterior a la postura, se ha convertido en una estrategia de control de *Salmonella* Enteritidis clave en países desarrollados, y la mantención adecuada de esta cadena en los centros de venta y en el domicilio del consumidor es fundamental para disminuir la incidencia de la enfermedad causada por esta bacteria en el hombre (Quiroz, 1987; Nagaraja *et al.*, 1991; Gast, 2000; Fica *et al.*, 2001).

La educación de las personas, tanto de manipuladores de alimentos como consumidores, es necesaria no sólo para mantener las cadenas de frío, sino que también para lograr la cocción adecuada de los alimentos que contienen huevo o derivados de éste. La ingestión de huevos con yemas líquidas representa mayor riesgo que un huevo bien cocido. Los huevos sucios y agrietados, no deberían ser consumidos, y además un huevo crudo o un subproducto de éste no debería ser conservado a temperatura ambiente por más de dos horas (Parra *et al.*, 2002).

En Chile hasta el año 2001, en que se realizó el último estudio al respecto, no existía una regulación clara para el control de las infecciones causadas por *Salmonella* Enteritidis. Las cadenas de frío no estaban totalmente incorporadas en el nivel productivo y tampoco eran consideradas por comerciantes y consumidores. Las campañas de educación eran ocasionales y en general respondían a la alarma pública causada por la aparición de brotes que eran ampliamente difundidos por la prensa (Fica *et al.*, 2001).

2.6 Técnicas diagnósticas utilizadas para detectar *Salmonella spp* en productos avícolas.

Debido a que *Salmonella spp* es una de las principales bacterias asociadas a brotes de ETAs producidas por productos de la industria avícola, su detección e identificación en todos los puntos de la cadena de producción, es un componente fundamental de la vigilancia epidemiológica y el control de este microorganismo (Velilla *et al.*, 2004).

El método de diagnóstico ideal, es aquel cuya especificidad y sensibilidad sea lo más alta posible, de modo que el 100% de las muestras contaminadas pudiese ser exitosamente diagnosticada. Se espera que la técnica utilizada permita procesar un alto número de muestras en forma simultánea, que entregue resultados al cabo de poco tiempo, y a bajo costo (Shrank *et al.*, 2001).

Si bien hasta el día de hoy no existe un método de diagnóstico que cumpla con todas y cada una de estas condiciones, hay variadas técnicas que pueden usarse en forma individual o complementaria para así alcanzar mejores resultados en la identificación de *Salmonella* spp.

2.6.1 Técnica de diagnóstico tradicional de *Salmonella* spp por cultivo bacteriológico.

La técnica tradicional empleada para detectar e identificar *Salmonella* spp es el cultivo bacteriológico seguido de pruebas bioquímicas y serológicas. Si bien este es el método internacionalmente aceptado por los laboratorios especializados y Servicios de Salud, presenta variadas limitantes, siendo las más importantes el prolongado tiempo que requiere para entregar resultados (4 a 7 días), y que su sensibilidad disminuye al existir células no viables en la muestra, o por baja carga inicial de bacterias (Whyte *et al.*, 2002).

El aislamiento y la identificación bacteriana mediante cultivo bacteriológico, sigue un esquema que consta de 4 etapas básicas: a) Pre enriquecimiento en medios líquidos no selectivos, b) Enriquecimiento en medios selectivos, c) Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos, d) Confirmación bioquímica y serológica de las colonias sospechosas (Velilla *et al.*, 2004). Todos estos pasos, requeridos para una correcta identificación de *Salmonella* spp, hacen que el proceso tome en promedio 4 a 7 días, además de ser laborioso y costoso (Shrank *et al.*, 2001).

a) Pre enriquecimiento en medios líquidos no selectivos

Este tratamiento es usualmente recomendado para la detección e identificación de *Salmonella* spp en muestras alimentarias. Los caldos de pre enriquecimiento no selectivos, favorecen el crecimiento bacteriano en muestras con baja carga bacteriana inicial, aunque como lo dice su nombre, al no ser selectivos no son inhibidores del crecimiento de la flora coexistente. Estos medios también son beneficiosos para la recuperación de salmonelas que han sufrido daños por procesos tecnológicos como calor, congelación, deshidratación, etc (Jiang *et al.*, 1998)

Actualmente los medios de pre enriquecimiento más comúnmente utilizados son el agua peptonada fosfatada (APF), caldo tripticasa de soya (CTS), caldo nutritivo (CN) y últimamente el caldo de pre enriquecimiento universal (CPU). Las muestras en estos caldos se incuban por 18 a 24 horas a temperaturas que fluctúan entre 35 y 37°C (Jiang *et al.*, 1998).

b) Enriquecimiento en medios selectivos

Es difícil aislar *Salmonella* spp desde muestras que contengan una gran cantidad de microorganismos pertenecientes a la flora bacteriana normal y una baja cantidad de esta bacteria. Ejemplos de esto son las heces, tejidos, alimentos y muestras ambientales. Para contrarrestar esta situación se usan medios de enriquecimiento selectivos, los cuales como dice su nombre, son utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas especies bacterianas, mientras que al mismo tiempo inhiben el desarrollo de microorganismos no deseados. Estos medios son particularmente provechosos para recuperar *Salmonella* spp de muestras de heces de animales portadores que poseen bacterias en una cantidad menor a 200 bacterias /gramo de heces (Koneman *et al.*, 1986).

Si bien existen varios medios de enriquecimiento selectivo, los más utilizados en el caso de *Salmonella* spp, son el caldo Rappaport Vassiliadis (RV), caldo Tetrionato (CT) (Tetrionato Mueller-Kauffman, verde brillante, Hajna, y Tetrionato adicionado con novobiocina) y caldo Selenito (CS) (selenito verde brillante, selenito cistina, etc) (Carloni, 1996; Carter, 1984).

Es importante tener en cuenta que algunos medios de enriquecimiento pueden ser tóxicos para algunos serotipos de *Salmonella*, como por ejemplo el caso de *S. Typhisuis*, *S. Cholerasuis*, *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* cuyo crecimiento es inhibido por el CS y CT (Carter, 1984). Por su parte Banwart y Ayres el año 1953, demostraron que el CT tenía un efecto tóxico sobre *S. Paratiphy*.

No todos los medios de enriquecimiento poseen la misma eficiencia, ya que ésta es influenciada por variados factores, entre los cuales se encuentran el tipo de muestra

analizada, la proporción de inóculo adicionado al medio y el tiempo y temperatura de incubación. De esta forma la efectividad del CS y CT se ven disminuidas en presencia de albúmina. Además una gran cantidad de inóculo disminuye la selectividad del medio (Carter, 1984).

La temperatura y el tiempo de incubación varían de acuerdo al medio seleccionado, entre 37 y 43°C durante 24 y 48 horas (Carter, 1984., Kafel y Bryan, 1977).

c) Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos

Luego de incubar la muestra en medios selectivos de enriquecimiento, se realiza la siembra en medios sólidos. Dichos medios poseen distintas sustancias selectivas y diferenciales que permiten el aislamiento y diferenciación de las colonias de *Salmonella* spp, de otras colonias bacterianas (Koneman *et al.*, 1986)

De acuerdo a Carloni (1996), estos medios sólidos pueden diferenciarse de acuerdo a su selectividad de la siguiente manera:

- Medios de selectividad escasa: Son aquellos que permiten el desarrollo de todas las enterobacterias y todas las salmonelas, como el agar Mc Conkey.
- Medios de selectividad media: Son aquellos que inhiben algunas enterobacterias, pero desarrollan todas las salmonelas como el agar verde brillante y el agar citrato desoxicolato.
- Medios de selectividad intensa: Aquellos que inhiben la mayoría de las enterobacterias, pero también de algunas salmonelas como el agar Salmonella Shigella (SS) y agar xilosa-lisina dexocicolato (XLD). En la última década se comenzó a utilizar en forma cada vez más frecuente el agar XLT-4 (xilosa lisina tergitol 4) para la detección de salmonelas no tifoidales (Dusch y Altwegg, 1995)

Todos los medios se incuban en aerobiosis a 37°C por un periodo de 24 horas (Velilla *et al.*, 2004). La utilización de sustratos bioquímicos es la base para la identificación de *Salmonella* spp ya que la diferenciación de sus colonias con las de otros

microorganismos, es usualmente determinada por los cambios de color que corresponden a la fermentación de la lactosa o sacarosa, asimismo la producción de H₂S, o la descarboxilación de lisina, entre otros (Koneman *et al.*, 1986)

Los medios selectivos más utilizados son Agar Verde Brillante, agar Mc Conkey, SS y XLD (Carter, 1984; Koneman *et al.*, 1986). No todos los medios sólidos poseen la misma eficiencia, de este modo algunas cepas de *S. Pullorum* sólo crecen en agar Mc Conkey, y *S. Choleraesuis* en agar Mc Conkey y XLD (Carter, 1984). Por otra parte *Salmonella* Tiphth y Paratiphth no crecerían en agar XLT-4 (Dusch y Altwegg, 1995)

Murray y Barton, (1987) recomiendan una combinación de enriquecimiento en caldo RV unido a siembra en agar XLD para aislar *Salmonella* spp desde muestras de tejidos de animales, sin necesidad de pasar por el paso previo del pre enriquecimiento no selectivo, el cual se utiliza generalmente en muestras alimenticias.

d) Confirmación bioquímica y serológica de las colonias sospechosas

Si bien las colonias obtenidas en los medios selectivos sólidos permiten una identificación preliminar de *Salmonella* spp, para lograr una plena identificación se requiere la determinación de características fenotípicas que reflejen el código genético e identidad única del organismo estudiado. Existen diversas pruebas para llevar cabo la identificación de *Salmonella* spp, entre las cuales se incluyen la producción de indol, utilización de citrato y carbohidratos, producción de ureasa, descarboxilación de lisina y ornitina, producción de fenilalanina, H₂S, etc. (Koneman *et al.*, 1986).

Para poder determinar el grupo serológico al que pertenece una salmonela identificada por las pruebas bioquímicas, se realiza una prueba de aglutinación simple en placa con la cual se busca identificar la presencia de antígenos O y Vi. Para esto se usan antisueros comerciales los cuales cubren la gran mayoría de los serogrupos (Carter, 1984).

2.6.2 Técnicas de diagnóstico de *Salmonella* spp no convencionales.

Como se ha mencionado, los métodos de diagnóstico tradicionales de *Salmonella* spp en muestras de aves, toman un largo periodo de tiempo (hasta 7 días) en determinar si es positiva o negativa. Esto hace que los productores avícolas se vean en la encrucijada de aumentar sus costos de producción por mantener sus aves confinadas hasta obtener resultados que confirmen si sus animales y galpones están o no contaminados o bien, arriesgarse a que todos sus productos sean confiscados, si es que *Salmonella* spp es detectada en alguno de éstos una vez que han dejado la planta procesadora y han ingresado a la cadena de comercialización (Peplow *et al.*, 1999)

Es por esto que en un intento continuo de reducir los tiempos y costos de realizar el cultivo tradicional, se han desarrollado una gran variedad de técnicas de diagnóstico rápidos, no convencionales, como métodos “screening” para detectar *Salmonella* spp. Estas técnicas incluyen el uso métodos basados en la modificación del sistema tradicional de cultivo (filtración por membrana y uso de medios de enriquecimiento selectivo semisólidos), métodos de medición de la actividad metabólica de las bacterias mediante el uso de medios selectivos (técnica impedimetría), métodos inmunológicos (filtración inmunomagnética, inmunofluorescencia y ELISA) y detección de ácidos nucleicos (hibridación con sondas y PCR) (Peplow *et al.*, 1999; Voogt *et al.*, 2001; Shrank *et al.*, 2001)

Si bien la gran mayoría de estos métodos no convencionales de detección de *Salmonella* spp, logran reducir el tiempo de diagnóstico hasta a 24 horas, además de que pueden procesar una gran cantidad de muestras y a bajo costo, muchos de ellos han evidenciado niveles de sensibilidad y especificidad menores a los alcanzados por la prueba de diagnóstico tradicional (Blackburn, 1993; Hanai *et al.*, 1996; Peplow *et al.*, 1999). Además, a pesar de ser fáciles de llevar a cabo, han presentado dificultades a la hora de ser leídos e interpretados, lo cual puede conducir a resultados erróneos. Finalmente, los diseños de varias de estas pruebas fueron desarrollados para ser utilizados en muestras de

alimentos, y no en muestras de animales o ambientales con lo cual su eficiencia puede verse disminuida (Blackburn, 1993; Peplow *et al.*, 1999).

2.6.2.1 Método convencional modificado

Estas técnicas diagnósticas tienen como fin disminuir el tiempo de la fase de enriquecimiento selectivo del cultivo bacteriológico tradicional.

a) Método de filtración por membrana.

Kenner *et al.* (1952) desarrollaron un sistema para identificación de *Salmonella* spp, que se basaba en el método tradicional de cultivo, pero en el que se incluyó el uso de membranas de filtración luego de una etapa de enriquecimiento selectivo de 6 horas. Las bacterias filtradas, son sembradas en medios sólidos selectivos con lo cual el tiempo total del diagnóstico se acortó a 2 o 3 días. Sin embargo, este método presentó un porcentaje de recuperación de la bacteria de sólo un 60%.

El año 1982, Entis *et al.*, modificaron el método propuesto por Kenner, usando membranas hidrofóbicas que permitían la detección y enumeración específica de microorganismos aún en presencia de una gran cantidad de flora bacteriana. De este modo el método propuesto consiste en un pre enriquecimiento en medios no selectivos (18 - 24 hrs), seguido de un enriquecimiento en medios selectivos por 6 horas, para luego ser filtrada y finalmente sembrada en medios selectivos diferenciales. Con este sistema se obtuvo una tasa de detección de un 94,6%, la cual es similar a la obtenida por el cultivo bacteriológico (96,7%), tardando solo 2 a 3 días en el procedimiento.

Peplow *et al.* (1999) usaron el sistema de filtración por membrana hidrofóbica y el cultivo bacteriológico para detectar *Salmonella* spp en muestras de pollos (tórulas cloacales) inoculadas con cantidades bacterianas menores o iguales a 10^3 UFC/ml, pero con una gran cantidad de flora bacteriana coexistente, y obtuvieron una tasa de detección de

27,5%, y 44,1% respectivamente. Esto demuestra que este sistema podría ser ineficiente en muestras de animales o ambientales que posean una gran cantidad de microflora bacteriana.

b) Métodos de enriquecimiento en medios selectivos semi - sólidos.

Estos métodos se basan en la motilidad de la mayoría de las bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, la cual les permite migrar a través de un medio semi sólido altamente selectivo (Voogt *et al.*, 2001).

Algunos de estos medios son usados para realizar enriquecimiento selectivo secundario en la prueba de cultivo tradicional. Smeltzer y Duncalfe el año 1979, utilizaron el método de selectividad por motilidad de Harper y Shortridge como medio de enriquecimiento secundario, luego de usar caldo tetrionato como medio selectivo primario en muestras naturalmente contaminadas con *Salmonella* spp y obtuvieron una sensibilidad de un 82%, contra un 74% al utilizar sólo el enriquecimiento con tetrionato. Sin embargo, los autores advierten que este doble enriquecimiento selectivo hace el proceso de diagnóstico aún más largo de lo normal.

El medio Rappaport Vassiliadis semi sólido modificado (MSRV) es el más utilizado. La técnica consiste en un pre enriquecimiento por 24 horas, seguido de la inoculación de las placas de MRSV, con 3 gotas del medio de pre enriquecimiento para después incubarlo a 42°C por 24 horas. La migración bacteriana se observa como una zona turbia y grisácea alrededor de las gotas inoculadas, lo cual se considera como muestras presuntamente positivas, que deben confirmarse con pruebas bioquímicas y serológicas. Zdragas *et al.*, (2000) probaron esa técnica en muestras de productos avícolas (intestino y órganos internos) y la compararon con el cultivo con enriquecimiento en caldo RV y obtuvieron una sensibilidad de 100 y 81% respectivamente. La especificidad fue de 100% para ambos casos, tardando el primer método solo 48 horas en realizar el diagnóstico.

Por su parte, Voogt *et al.*, (2001), compararon la técnica con MSRV, y con caldo RV para detectar *Salmonella* spp en muestras de heces de pollos y obtuvieron sensibilidades de 93% y 60% respectivamente. Pese a lo anterior, Dush y Altwegg (1995),

señalan que el medio MSR/V podría inhibir el crecimiento de *S. Tiph* y *S. Paratiph*, por lo cual lo recomiendan sólo para salmonelas no tifoidales.

2.6.2.2 Método de la impedancia

Cuando un microorganismo crece en un medio de cultivo, produce cambios en la composición química de éste debido al consumo de nutrientes, al mismo tiempo que elimina productos metabólicos. El método de la impedancia consiste en una técnica rápida y automatizada que permite medir el cambio de la conductancia en un medio, el cual es inducido por el metabolismo bacteriano. El tiempo de detección es una función de la concentración inicial de bacterias y la cinética de crecimiento que éstas tengan en un determinado medio (Cady *et al.*, 1978; Blivet *et al.*, 1998)

De acuerdo a Schinking (2003) la técnica más eficiente consistiría en un pre-enriquecimiento en un medio no selectivo, como el agua peptonada fosfatada, por un corto periodo de tiempo seguido por 24 horas de enriquecimiento en un medio líquido selectivo (RV, SC, etc) en el que luego se hace la medición de la impedancia con un equipo automatizado.

Los resultados obtenidos al usar esta técnica, son bastante variados, ya que por ejemplo su especificidad, en gran medida depende del medio de cultivo utilizado para el desarrollo bacteriano. Blivet *et al* (1998), usando este método, lograron detectar *Salmonella* spp en sólo 12 horas en concentraciones de aproximadamente 10^2 UFC. Sin embargo, advierten que algunos serotipos no pudieron ser diagnosticados al ser cultivados en medios que tuviesen ciertas sustancias inhibitoras como cristal violeta.

Por su parte, Quinn *et al* (1995) al comparar este sistema con el cultivo bacteriológico, para detectar *Salmonella* spp en muestras ambientales y de alimentos para pollos, obtuvieron sensibilidades de 25,5% y 38,4% respectivamente.

2.6.2.3 Técnicas inmunológicas

Estas técnicas se basan en el uso de anticuerpos mono o policlonales, los cuales reaccionan con los antígenos, ya sean somáticos o flagelares, presentes en la bacteria que se pretende detectar.

a) Filtración inmunomagnética.

Esta metodología se utiliza para separar una especie bacteriana de una mezcla de microorganismos en suspensión utilizando partículas inmunomagnéticas sensibilizadas con anticuerpos específicos. Dichas partículas pueden ser de dos tipos: microperlas con anticuerpos adheridos en su superficie, o ferrofluidos, que son suspensiones de partículas coloidales también sensibilizadas con anticuerpos (Álvarez *et al.*, 1999)

La reacción de las partículas con los microorganismos se produce cuando éstas son mezcladas con una suspensión bacteriana. Las bacterias se unen a los anticuerpos específicos de la superficie de las partículas por una reacción antígeno anticuerpo. Luego, las partículas son extraídas del medio líquido gracias a la aplicación de un campo magnético, consiguiendo así que las bacterias sean arrastradas en el proceso. Este proceso puede llevarse a cabo directamente a partir de los caldos de pre enriquecimiento incubados por 6 o 7 horas, eliminando la necesidad de utilizar medios de enriquecimiento selectivo, con la consiguiente disminución de 24 horas (Hanai *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 1999)

Hanai *et al* (1997) y Jeníková *et al* (2000) recomiendan esta prueba como una forma de pre-tratamiento de muestras, para así purificarlas en forma rápida y luego llevar a cabo pruebas de diagnóstico como el cultivo bacteriológico o bien el PCR, ya que por sí sola no poseería niveles de detección adecuados.

b) Inmunofluorescencia

Esta técnica, que consiste en utilizar anticuerpos para los antígenos de *Salmonella* O y H, marcados con sustancias fluorescentes, ha sido utilizada en la industria avícola para detectar *Salmonella* spp de una manera más rápida que el cultivo tradicional.

Cloak *et al* (1999) utilizaron la prueba de inmunofluorescencia para detectar *Salmonella* spp a partir de muestras de carne de pollo inoculadas experimentalmente. Para ello, sometieron a las muestras a una incubación en agua peptonada fosfatada a 37°C por 24 horas, y luego las bacterias fueron aisladas por medio de adhesión superficial de éstas a una membrana de policarbonato unida a un portaobjetos. Posteriormente dichas bacterias fueron detectadas gracias a la utilización de anticuerpos marcados con fluoresceína, específicos para los antígenos O y H. Gracias a esta técnica se logró detectar *Salmonella* spp en sólo 24 horas, sin obtener resultados falsos negativos ni positivos, y presentando una concordancia de un 100% con la prueba del cultivo bacteriológico.

Algunos trabajos, como los de Caldwell *et al*, (1966), e Insalata *et al*, (1967), describían problemas de especificidad para esta prueba, asociados especialmente al uso de anticuerpos para los antígenos somáticos (O) de *Salmonella* spp. Sin embargo, dichas dificultades parecen haber sido superadas, tal como lo demuestran el trabajo de Cloak *et al*, (1999) al utilizar anticuerpos tanto para el antígeno O, como para el H.

c) Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

Dentro de las pruebas inmunológicas, los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) están entre los más utilizados. En esta técnica se une una enzima a un anticuerpo, el cual es específico contra el microorganismo que se quiere encontrar. Se usan medios sólidos para anclar el complejo antígeno anticuerpo, y una vez que éste se forma, se añade un sustrato, el cual cambia de color en presencia de la enzima. En el diagnóstico de *Salmonella* spp, dicha técnica posee variadas ventajas, entre las que se encuentran la capacidad de detectar antígenos bacterianos, aún si las células no son viables. Por otra parte, muchos ELISA usan anticuerpos policlonales, los cuales han demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad. Sin embargo, usar anticuerpos policlonales puede potenciar la ocurrencia de reacciones inespecíficas (Dos Santos *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 1996)

Dos Santos *et al* (2006) utilizaron un ELISA indirecto para detectar *Salmonella* Enteritidis en 154 muestras de carne de pollo. Con esta técnica lograron obtener resultados en 30 horas desde que las muestras fueron recibidas, obteniendo una prevalencia de un 26%

contra un 23% del cultivo tradicional. Además obtuvieron sensibilidad y especificidad de un 94% para la prueba inmunológica. Se obtuvieron 7 resultados falsos positivos, los cuales fueron atribuidos a reacciones cruzadas de los anticuerpos con antígenos de otros microorganismos presentes en las muestras.

Por su parte, Van Zijderveld *et al* (1992) llevaron a cabo un ELISA indirecto que utilizaba dos anticuerpos monoclonales contra el antígeno flagelar de *Salmonella* Enteritidis, en pollos experimentalmente infectados. Los resultados obtenidos fueron de una sensibilidad y especificidad de un 100%, con lo cual proponen a esta técnica como la adecuada para realizar screening en planteles avícolas.

Ng *et al.*, (1996) utilizaron un ELISA de captura para detectar *Salmonella* spp en muestras de alimentos (huevos, leche, cerdo) incubados en medios de pre enriquecimiento por 6 horas, y en caldo RV por 24 horas a 37°C. Si bien alcanzaron una sensibilidad de un 100% y una especificidad de un 99%, advierten que los pasos de pre enriquecimiento y enriquecimiento de las muestras son necesarias para alcanzar buenos resultados, ya que la técnica utilizada detecta bacterias en concentraciones entre 10^5 y 10^7 bacterias/ml de muestra.

2.6.2.4 Técnicas de detección de ácidos nucleicos.

Estas técnicas, tal como lo dice su nombre, permiten detectar zonas de ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN, específicos de un microorganismo. Los métodos de análisis de ácidos nucleicos, han atraído la atención del mundo científico en forma creciente en los últimos años, y cada día se usan más en los laboratorios como pruebas de diagnóstico rutinario. Las ventajas de estas técnicas es que no necesitan largos procesos de aislamiento bacteriano, son capaces de detectar organismos no viables, e incluso encontrar mutaciones o alteraciones del material genético (Wolcott, 1992)

Entre las técnicas diagnósticas de detección de ácido nucleicos más usadas están: a) Hibridación y b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

a) Hibridación de ácidos nucleicos

Esta metodología utiliza una sonda, que consiste en una secuencia de nucleótidos corta con la capacidad de unirse a segmentos específicos de una secuencia de ADN, que está marcada con agentes fluorescentes o radiactivos, los cuales emiten una señal que puede ser leída, cuando ésta se une en forma específica a un segmento del ADN de la bacteria (hibridación) (Wolcott, 1992)

Fitts *et al* (1983) utilizaron una sonda específica para detectar *Salmonella* spp inoculadas en distintas muestras alimenticias, las cuales incluían huevos, queso y soya, entre otros. Éstas fueron incubadas en caldos de pre enriquecimiento a 37°C por 24 horas. Se filtraron y se sometieron a la prueba de hibridación. Se encontró *Salmonella* spp en todas las muestras analizadas, lo cual prueba que la matriz de las muestras no tiene un efecto inhibitorio en la prueba. Sin embargo, las concentraciones bacterianas detectadas variaron entre 10^8 y 10^9 bacterias/ml, y los autores advierten que a concentraciones más bajas, por ejemplo en muestras naturalmente contaminadas, la sensibilidad de la prueba podría verse disminuida. Es por ésto que recomiendan usarla en forma complementaria a otro tipo de diagnóstico.

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Dentro de las metodologías diagnósticas que se basan en la detección de ácidos nucleicos, el PCR es la técnica más utilizada. Ésta se basa en la amplificación repetitiva de un segmento específico de una hebra de ADN, denominado templado o hebra blanco (Powledge, 2004).

El PCR consiste en la repetición consecutiva de 3 pasos básicos, que en conjunto conforman un ciclo. Primero, el ADN blanco debe sufrir un proceso de denaturación, de modo que las hebras dobles, se separen formando hebras simples. Este proceso se lleva cabo a temperaturas que varían entre los 90 y 96°C. El segundo paso es la hibridación o “annealing” en la cual los partidores, que consisten en una cadena de 15 a 30 oligonucleótidos que son complementarios a la zona flanqueante de la hebra blanco, se unen a ésta. La temperatura de esta etapa es específica de cada partidore. La tercera y última

etapa es la síntesis del ADN gracias a la acción de una polimerasa termoestable, la cual comenzando desde los partidores, “lee” la hebra blanco, y va uniendo nucleótidos que formarán la hebra complementaria a ésta. El resultado son dos hebras dobles de ADN, conformadas por una hebra original, y la nueva hebra formada, las cuales serán el templado o molde del ciclo siguiente. Este proceso se repite entre 20 y 40 veces (Wolcott, 1992; Powlege, 2004).

Al finalizar la serie de ciclos se han generado millones de copias de una zona del ADN original, las cuales son visualizadas como bandas al realizar una electroforesis, en la que el ADN se separa de acuerdo a su peso molecular (Sun *et al.*, 1982; Sambrook *et al.*, 1989; Powledge, 2004).

La contaminación de la muestra con ADN externo, es un importante problema que puede producirse al realizar la prueba de PCR, ya que lleva a la amplificación de material genético inespecífico que es irrelevante para la prueba. Por esto, en los laboratorios donde se practica esta metodología diagnóstica deben tomarse medidas precautorias para evitar el ingreso de moléculas de ADN contaminantes, especialmente moléculas que provengan de experiencias anteriores a la que se está realizando (Wolcott, 1992; Powledge, 2004; Wilson, 1997).

La especificidad de la prueba de PCR, depende de qué tan específicos sean los partidores que se usen. Existen muchos partidores que han sido utilizados para detectar *Salmonella* spp, como son los que amplifican secuencias específicas de los genes *invA*, *invE*, *ompC*, *oriC*, *hilA*, entre otros (Malorny *et al.*, 2003; Pathmanathan *et al.*, 2003; Kwan *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1994).

Existen casos en los que si bien los partidores son específicos para *Salmonella* spp, es decir, no producen amplificación de genes de otras especies, no son capaces de detectar todos los serotipos de *Salmonella* existentes, o al menos los más importantes desde un punto de vista epidemiológico. Malorny *et al.* (2003) realizaron un estudio de validación del PCR como metodología diagnóstica para detectar *Salmonella*, en el que compararon

partidores para detectar 4 genes específicos de *Salmonella* spp (*oriC*, *ompC*, *Random Fragment* e *invA*). Utilizaron 242 cepas de *Salmonella* spp, que representaban todas las subespecies, con énfasis en los 10 serotipos más importantes para el país. También fueron seleccionadas 122 cepas no-*Salmonella*, que corresponden a enterobacterias cercanamente relacionadas a *Salmonella* spp, o que se encuentran en el mismo ambiente y crecen bajo las mismas condiciones que ésta. Todas las bacterias se inocularon en caldo Luria Bertani (LB) a 37°C por 16 horas y posteriormente se sometieron a un sencillo tratamiento térmico con el que se buscó la lisis bacteriana. Los partidores del gen *invA* fueron los únicos capaces de detectar 241 de las 242 cepas de *Salmonella* spp, sólo fallando en reconocer una cepa perteneciente al serotipo Saintpaul. A su vez, de las 122 enterobacterias no-*Salmonella*, sólo amplificó dos cepas (*E. coli* y *Citrobacter* spp.) produciendo fragmentos de mayor tamaño, claramente diferenciables del obtenido por *Salmonella* spp. Los otros partidores utilizados, fallaron en detectar 2 o 3 de las cepas de *Salmonella* spp utilizadas. Sin embargo, su principal problema fue que amplificaron diferentes cepas de enterobacterias con fragmentos de tamaños similares a los de *Salmonella* spp, lo que podría llevar a confusión y resultados erróneos.

El gen *invA* está presente en la mayoría de las cepas virulentas de *Salmonella*, y es uno de los encargados de codificar proteínas bacterianas involucradas en la invasión celular de la bacteria al hospedero (Galán *et al.*, 1992).

Existen numerosos trabajos que han determinado la sensibilidad de la prueba de PCR obteniéndose resultados variados. Kwan *et al* (1995), diseñaron una prueba en que se inocularon caldos de enriquecimiento con distintas concentraciones bacterianas de *Salmonella* spp, las cuales variaron entre 4×10^8 y 4×10^1 células/ml, para así determinar cual era la cantidad mínima de bacterias que la prueba de PCR era capaz de detectar. Como resultado obtuvieron una capacidad de detección de hasta 4×10^2 células/ml.

Pathmanathan *et al* (2003) hicieron el mismo procedimiento y obtuvieron resultados de 120 UFC por PCR, mientras que Stone *et al* (1994) obtuvieron un nivel de detección de 90 UFC.

Al utilizar muestras cuyas matrices sean complejas, ya sean clínicas, de alimentos o ambientales, la sensibilidad de la prueba de PCR puede verse disminuida por diversas razones, como es la presencia de sustancias inhibidoras, la ineficiente exposición de los ácidos nucleicos a la polimerasa termoestable, y la baja carga inicial de bacterias en la muestra (Wilson, 1997; Löfström *et al.*, 2003; Lampel *et al.*, 2000).

Existe una gran variedad de sustancias que pueden actuar como inhibidores de la prueba de PCR, y entre éstas se encuentran componentes de tejidos y fluidos orgánicos (hemoglobina, urea, heparina, sales biliares), constituyentes de los alimentos (grasas, proteínas, glicógeno, Ca⁺⁺) y elementos ambientales (metales pesados, polen). Dichos inhibidores actúan principalmente por medio de tres mecanismos: a) interferencia en la lisis celular durante el proceso de extracción del ADN, b) degradación o captura de los ácidos nucleicos, ó c) inactivación de la polimerasa termoestable. Es importante destacar que aún hay muchos inhibidores cuya identidad y mecanismo de acción no están descubiertos (Wilson, 1997).

Dentro del laboratorio, también se puede encontrar inhibidores de la prueba de PCR, como lo son el talco y el plástico de algunos utensilios. El talco de los guantes usados en los laboratorios es reconocido como un inhibidor de la amplificación, que actúa por medio de captura inespecífica de ácidos nucleicos. Es por esto que se deben tomar precauciones especiales para evitar contaminación con estas sustancias (Wilson, 1997).

Para contrarrestar los problemas de sensibilidad causados por la presencia de inhibidores, el método más utilizado es incubar las muestras en caldos de enriquecimiento (caldo de infusión de cerebro, TT, RV o SC), a 37°C por periodos que varían entre las 6 y 48 horas. Con esto se logra diluir los inhibidores presentes en la muestra a concentraciones que no interfieren con la prueba de PCR. Además de esto, este tratamiento logra recuperar células dañadas y favorecer el crecimiento de las bacterias, de modo de aumentar la cantidad de microorganismos que la prueba puede detectar (Wilson, 1997; Löfström *et al.*, 2003)

Pathmanathan *et al* (2003) analizaron la sensibilidad del PCR en muestras de heces humanas inoculadas con *Salmonella* Typhimurium. Se hicieron 3 grupos, en que el primero no se sometió a incubación en caldo de enriquecimiento, mientras que el segundo y tercero se inocularon en caldo de infusión de cerebro a 37°C por 4 y 6 horas respectivamente. Al realizar la prueba de PCR en las muestras del grupo que no fue sometido a tratamiento con caldo de enriquecimiento, se obtuvo una sensibilidad de 3×10^5 UFC/ml. En el grupo que fue incubado por 4 horas, ésta aumentó a 3×10^4 UFC/ml, y al incrementar el tiempo de incubación a 6 horas, la sensibilidad creció a 3×10^2 UFC/ml.

Por su parte, Stone *et al* (1994), usando muestras fecales de perro inoculadas con *Salmonella spp*, no pudieron detectar la bacteria en muestras que no fueron sometidas a enriquecimiento. Sin embargo, al usar cuatro caldos de enriquecimiento selectivo (caldo de infusión de cerebro, TT, RV y SC) la prueba de PCR logró una detección de hasta 80 UFC, siendo los caldos de infusión de cerebro y SC los mejores. A pesar de que en este trabajo se describe al caldo TT como posible inhibidor del crecimiento de *Salmonella spp*, en años posteriores Shrank *et al* (2003) compararon este medio de enriquecimiento con el caldo SC, encontrando que las muestras enriquecidas con TT, requerían menor tiempo de incubación (sólo 6 horas) para que la prueba de PCR pudiera detectar bacterias en ellas, mientras que a las muestras enriquecidas con SC, les tomaba al menos 10 horas.

Para que la prueba de PCR sea eficiente en muestras con matrices complejas, es importante la exposición del ADN bacteriano a los partidores y por sobre todo a la polimerasa termoestable. La degradación o captura de los ácidos nucleicos puede producir falla en el diagnóstico por medio del PCR. Restos celulares, detritus bacterianos, proteínas y polisacáridos son sustancias que reconocidamente provocan que el ADN no esté disponible para la polimerasa. Por esto, la utilización de métodos de extracción de ADN se hacen cada vez más comunes en los laboratorios que poseen la metodología de PCR como herramienta diagnóstica (Wilson, 1997)

Existen diversas formas de lograr la extracción de ADN, entre los cuales se encuentran la aplicación de calor (hervir la muestra), extracción con productos alcalinos

(NaOH), extracción por medio de uso de solventes orgánicos como el fenol y el cloroformo, y productos comerciales que incluyen mezclas de estas técnicas junto con centrifugaciones que finalmente logran exponer el material genético a los reactivos del PCR (Freschi *et al.*, 2005; De Medici *et al.*, 2003)

Freschi *et al* (2005) probaron 3 métodos de extracción de ADN (calentamiento y centrifugación, Kit comercial que incluye el uso de soluciones salinas, y método de fenol cloroformo) y los combinaron con incubación en distintos caldos de enriquecimiento (SC, TT y RV). Usaron muestras de heces de cerdo y las inocularon con *Salmonella* Typhimurium. Como resultados obtuvieron que la combinación del método de fenol cloroformo con incubación en caldo RV era la más eficiente lográndose una detección de 3.6×10^1 UFC por gramo de muestra. Sin embargo, recomiendan el uso del método de extracción por calor y centrifugación en caso de que los costos de usar otros métodos sean elevados, ya que a pesar de no alcanzar la eficiencia del método de extracción de fenol cloroformo, es eficaz de todas formas y tiene un muy bajo costo.

Finalmente, existen enzimas proteolíticas y sustancias denaturantes, como la urea, que producen inactivación de la polimerasa termoestable, de modo que ésta no puede crear la hebra complementaria a partir de la secuencia blanco, impidiendo así su amplificación (Wilson, 1997). El uso de polimerasas resistentes a estos inhibidores, es una alternativa que lentamente ha sido introducida en los diversos protocolos de PCR, y que ha logrado aumentar la sensibilidad de los ensayos, especialmente en aquellos en los que las muestras utilizadas poseen una alta cantidad de microflora bacteriana. De todas formas estas polimerasas resistentes a inhibidores no son capaces por si solas de superar los efectos que éstos provocan, por lo que se recomienda su utilización en conjunto con los ya mencionados métodos de enriquecimiento, los cuales diluyen los inhibidores (Löfström *et al.*, 2003)

Más allá de las limitaciones del PCR convencional recientemente expuestas, que poseen soluciones de mayor o menor complejidad para los diferentes laboratorios, ésta técnica posee desventajas importantes al compararla con la técnica del cultivo

bacteriológico tradicional. La más importante de ellas es que al no existir bacterias aisladas no se puede afirmar si éstas están vivas o muertas, y mucho menos se puede llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos ni tampoco pruebas serológicas o de tipificación, las cuales son importantes desde el punto de vista epidemiológico. Además de esto actualmente el PCR es una prueba de mayor costo que el cultivo bacteriológico, especialmente por conceptos de inversión inicial, lo que se traduce en compra de equipos e implementación (Kulkarni *et al.*, 2002).

b.1) Técnicas de PCR no convencionales.

Lo que se busca con estas metodologías es optimizar algunos parámetros del PCR convencional, como el número de genes que la prueba puede detectar en forma simultánea, la sensibilidad, y el tiempo que demora llevar a cabo la prueba.

b.1.1) PCR Múltiple (Multiplex PCR).

Esta técnica consigue detectar en forma simultánea y en un único tubo, diferentes secuencias blanco, permitiendo la detección e identificación de distintos genes de interés. Esto necesariamente implica el uso de más de un par de partidores, además de reactivos y programas adecuados que deben permitir la detección y amplificación de cada secuencia blanco, y no inhibir a las demás (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2004)

La elección o diseño de los partidores es el punto más crítico a la hora de realizar un PCR múltiple ya que el éxito de la prueba depende que éstos no interfieran unos con otros, por ello es que siempre se deben tener en cuenta cuatro puntos esenciales: a) escoger partidores que no interactúen entre si; b) que tengan temperaturas de hibridación similares; c) que cada pareja de partidores amplifique una secuencia blanco única y d) que generen hebras de tamaños suficientemente distintos como para poder ser diferenciados tras la amplificación (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2004)

Cortez *et al* (2006) utilizaron un PCR múltiple para detectar *Salmonella* spp, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis en forma simultánea a partir de 288

muestras encontradas en mataderos de pollos (agua de chiller, vísceras, heces, plumas, agua de lavado, carcasas) utilizando 3 pares de partidores, que detectaban 3 genes distintos (*invA*, *pefA* y *sefA*). Se detectaron un total de 52 muestras positivas, de las cuales 29 correspondían a *Salmonella* spp, 16 a *Salmonella* Enteritidis y 7 a *Salmonella* Typhimurium. Más allá de los resultados, esta experiencia demuestra el ahorro de tiempo y recursos para detectar distintos microorganismos, sin necesidad de hacer los diagnósticos por separado.

b.1.2) PCR anidado (Nested PCR).

Esta forma de PCR utiliza dos pares de partidores para detectar un mismo gen. El primer par se conoce como partidores externos, y el segundo como internos. Los partidores externos amplifican la secuencia blanco de la misma forma que un PCR convencional, mientras que los internos se unen al producto de la amplificación de la primera reacción. De esta forma, se hacen dos reacciones de PCR, en que el producto de la primera, es el molde de la segunda (Campbell, 2002).

La técnica del PCR anidado busca eliminar la posibilidad de amplificación inespecífica, ya que si por algún motivo el primer par de partidores produjese alguna amplificación errónea, la probabilidad de que el segundo par de partidores también se unan equivocadamente a una secuencia blanco extraña, es muy baja (Campbell, 2002).

Por otra parte hay, científicos que afirman que este PCR tiene mejor sensibilidad que el PCR convencional. Como la segunda reacción usa de molde el producto de la primera, se pueden producir una gran cantidad de amplicones, con una muy baja muestra de ADN molde inicial. Rychlík *et al* (1999) compararon la sensibilidad del PCR convencional y el anidado, para detectar *Salmonella* spp en muestras de heces y carne de pollos inoculadas con cantidades conocidas de la bacteria. En el caso de las muestras de heces, el PCR anidado obtuvo una sensibilidad 1000 veces mayor en comparación con el PCR convencional (10^2 UFC/gr y 10^5 UFC/gr respectivamente), mientras que con las muestras de carne la diferencia se acertó a 10 veces.

b.1.3) PCR de tiempo real (Real time PCR)

En el PCR de tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el tubo cerrado, sin necesidad de llevar a cabo algún método de visualización posterior. Para esto, se utilizan sustancias fluorescentes que actúan como agentes intercalantes o sondas de hibridación las cuales emiten una señal al unirse a moléculas de ADN. Esta señal es leída por el termociclador, el cual posee un lector de fluorescencia incorporado, lo que permite medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004)

La principal ventaja de esta técnica es su rapidez, puesto que no necesita un proceso de detección adicional luego de la amplificación, así el proceso puede llevarse a cabo hasta en 40 minutos, lo que a su vez permite un flujo mucho mayor de muestras y ensayos. Otra ventaja, es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma importante. Finalmente, esta técnica permite hacer una estimación de la cantidad de ADN bacteriano inicial que hay en las muestras, de modo de saber cual estaba más o menos contaminada (Costa, 2004)

Eygor *et al* (2002) determinaron que esta prueba tenía una sensibilidad de hasta 6 UFC/ml de muestra al realizarla en muestras de intestino de pollo artificialmente inoculadas con *Salmonella* Enteritidis. Para comparar su sensibilidad con la del cultivo bacteriológico, utilizaron 492 muestras de intestinos obtenidas de 47 galpones de aves. Las muestras fueron incubadas en caldo tetracionato por 18 horas a 37°C. De la totalidad de muestras 62 (12,6%) fueron positivas a *Salmonella* Enteritidis mediante PCR tiempo real, y 32 (6,5%) por la prueba del cultivo bacteriológico. Los autores resaltan el hecho que la prueba de PCR tiempo real, tomó menos de 24 horas en obtener resultados (18 horas de enriquecimiento y 30 minutos de PCR) mientras que el cultivo tomó al menos 3 días.

2.6.3 Utilización de PCR convencional y cultivo bacteriológico para la detección de *Salmonella spp* en muestras de la industria avícola.

La técnica de PCR convencional es utilizada en la industria avícola para analizar distintos tipos de muestras, en donde ha demostrado poseer mayor sensibilidad que el cultivo bacteriológico tradicional. Así en una experiencia diseñada por Shrank *et al* (2003) se comparó la sensibilidad del PCR convencional, con la del cultivo bacteriológico utilizando muestras de tonsilas cecales y vísceras de pollos que al día de edad fueron inoculados con 0,1 ml de caldo de enriquecimiento que contenía 4×10^3 UFC de *Salmonella* Enteritidis. Del total de 24 pollitos, 12 fueron sacrificados a las 48 horas post inoculación, y los 12 restantes a los 7 días. En cada uno de estos grupos, a 6 animales se les extrajeron un gramo de tonsilas cecales y a los otros 6, un gramo de vísceras, las cuales fueron inoculadas en caldo tetracionato por un periodo de 24 horas a 37°C.

La prueba de PCR demostró ser más sensible que el cultivo bacteriológico, tanto cuando los diagnósticos se realizaron a las 48 post inoculación, como a los 7 días. En el primer caso, la prueba de PCR detectó *Salmonella* Enteritidis en las 6 muestras de tonsilas cecales, y en 3 de las muestras de vísceras (75%), mientras que el cultivo tradicional obtuvo resultados positivos solamente en 3 muestras de vísceras (25%). Al hacer las pruebas diagnósticas a las muestras de los animales sacrificados a los 7 días post inoculación, ambas pruebas lograron mejores sensibilidades, obteniendo el PCR 5 muestras positivas en el caso de las muestras de tonsilas cecales, y 6 en las de vísceras (91,6%) y el cultivo tradicional 3 muestras positivas para tonsilas cecales y 6 en vísceras (75%).

Es importante destacar que aparte de los animales inoculados con *Salmonella* Enteritidis, esta experiencia también incluyó a un grupo de 24 animales que no fueron inoculados, pero que compartieron el espacio con los infectados, de modo de lograr transmisión horizontal de la bacteria, y que por lo tanto los pollitos tuviesen un nivel de infección menor que los inoculados. De estos animales, 3 de los 12 sacrificados a las 48 horas, fueron positivos a PCR (25%) y ninguno al cultivo bacteriológico. A los 7 días 5 fueron positivos a PCR (41,7 %), y sólo 2 al cultivo (16,7%).

Por su parte, Oliveira *et al* (2003) llevaron a cabo una experiencia similar utilizando 87 muestras de galpones avícolas continuamente monitoreados por *Salmonella* spp que incluían cama, vísceras y carne, y compararon la sensibilidad del PCR, y el cultivo bacteriológico tradicional. La primera prueba obtuvo 33 resultados positivos (37,9 %), mientras que la segunda sólo detectó 15 muestras positivas (17,2 %) y todas las muestras que fueron positivas a esta prueba también lo fueron al PCR.

A pesar de estos resultados, la prueba de PCR convencional sigue siendo recomendada como un complemento a la del cultivo tradicional, y no como su reemplazo, ya que la sensibilidad que se obtiene al utilizar las dos pruebas, suele ser mayor que el de cada una por separado. Así lo demuestran Whyte *et al* (2002) los cuales llevaron a cabo las pruebas de PCR y cultivo tradicional en 198 muestras de piel de cuello de pollo broiler comercial. El PCR fue capaz de detectar *Salmonella* spp en 38 muestras (19%), y el cultivo bacteriológico en 32 (16%), sin embargo, cuando se combinaron los resultados de las dos pruebas, la cantidad de muestras positivas fue 45 (23%). Esto ocurre porque a pesar de que el cultivo bacteriológico obtiene menor cantidad de muestras positivas que el PCR, hay muestras que son detectadas por el cultivo, y no por el diagnóstico molecular.

Al llevar a cabo la misma experiencia comparativa para detectar *Salmonella* spp a nivel de galpones de pollos, el PCR dio como positivos a 21 de los 40 galpones (53%), mientras que el cultivo bacteriológico sólo a 12 (30%). Cuando se realizaron las pruebas en forma conjunta el número de galpones positivos aumentó a 22 (55%)

En vista de las ventajas de la técnica del PCR convencional con respecto al cultivo bacteriológico, tanto desde el punto de vista de la sensibilidad y especificidad, como del tiempo de trabajo y entrega de resultados, su implementación constituye un complemento importante a la prueba tradicional y un aporte al diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en muestras de la industria avícola, especialmente para detectar posibles muestras positivas que hayan resultado negativas al cultivo bacteriológico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Implementar el diagnóstico molecular de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis.

3.2 Objetivos Específicos:

- Establecer la técnica de PCR convencional para la detección de *Salmonella* Enteritidis.
- Detectar *Salmonella* Enteritidis en muestras de tejidos de pollos experimentalmente infectados, mediante PCR convencional.

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1 Diseño: La implementación del PCR convencional se realizó en el contexto del proyecto FONDECYT 1060569 “Biocontrol de *Salmonella* en Medicina Veterinaria mediante el uso de bacteriófagos” realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Para ello se trabajó primero en una etapa de implementación, y luego en una etapa de procesamiento de muestras generadas por el proyecto. Dentro de ésta última se incluyó el análisis de todas las muestras que resultaron negativas al cultivo bacteriológico tradicional, de todos los grupos experimentales, de tal manera de mejorar la sensibilidad de la detección.

4.2 ETAPA 1: Establecer la técnica de PCR convencional para la detección de *Salmonella* Enteritidis.

Debido a que se trabajó con una cepa zoonótica, a lo largo de toda esta etapa se tomaron las medidas de bioseguridad descritas posteriormente en el punto 4.4.

4.2.1. Implementación PCR convencional para la detección de *Salmonella* Enteritidis:

Para llevar a cabo la prueba de PCR, se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) que posee 96 posillos de 0,2 ml cada uno.

- **Partidores:** Los partidores utilizados en la prueba fueron seleccionados por su alta especificidad para detectar *Salmonella* spp, de acuerdo a Malorny *et al*, (2003). Dichos partidores detectan una secuencia específica del gen *InvA* y producen hebras de ADN de tamaño conocido de 284 pares de bases. Éstos fueron elaborados por la empresa Fermelo®.

InvA1: 5` GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3` (26 pb)

InvA2: 5` TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3` (22 pb)

La reconstitución de los partidores se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fermelo®). Para esto, se agregó un volumen de agua libre de nucleasas (Winkler®), 10 veces mayor a la concentración en nanomoles del partidador. De esta solución madre se tomaron 10 µL y se diluyeron en 990 µL de agua libre de nucleasas, obteniendo así la solución que se agregó a la mezcla de reacción (Anexo 1)

- **Cepa:** *Salmonella* Enteritidis (S.E) resistente a ácido nalidíxico (*nal^r*) y rifampicina (*rif^r*) aislada en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y seleccionada como mutante espontánea doble resistente en el laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso por el doctor James Robeson.

4.2.1.1 Procedimiento:

La cepa de S.E fue inoculada en caldo Rapaport Vassiliadis (RV) y luego incubada por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se transfirieron 200 µL de este caldo a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Para verificar la ausencia de una posible interferencia del caldo RV en la prueba, se utilizaron 200 µL de este medio incubado a 37°C por 24 horas sin inóculo bacteriano.

Paralelamente se consideró el análisis de 25 cepas bacterianas de la Familia Enterobacteriaceae: 17 cepas de *E. coli* y 8 cepas de *Proteus spp* como una forma de corroborar la especificidad de los partidores (Malorny *et al.*, 2003)

a) Extracción del ADN

Se utilizó un kit comercial de extracción y purificación de ADN, Genomic DNA Purification Kit, Fermentas®.

A los 200 µL de muestra, se le agregaron 400 µL de solución de lisis, la cual tiene como función lisar y romper las células, de modo de dejar libre el ADN bacteriano. Se incubó a 65°C por 5 minutos y se homogeneizó manualmente cada un minuto y medio. Inmediatamente después se adicionaron 600 µL de cloroformo (Merk®), se mezcló

suavemente (invirtiendo los tubos 5 veces) y posteriormente la muestra se llevó a una centrífuga (Heraus Sepatech Biofuge®) donde se centrifugó a 10.000 rpm por dos minutos.

Paralelamente a la centrifugación se preparó la solución de precipitación, agregando 720 µL de agua libre de nucleasas (Winkler®) a 80 µL del concentrado de precipitación (10X) provisto por el kit.

Una vez terminada la centrifugación, la muestra se dividió en dos fases. La inferior que contiene restos celulares, y la fase superior que contiene el ADN bacteriano. Esta fase superior fue trasladada a un nuevo tubo eppendorf y se le agregaron los 800 µL de solución de precipitación, se mezcló suavemente, y posteriormente se llevó a centrifugación a 10.000 rpm por 2 minutos.

Luego el ADN forma un pellet que queda en el tubo, mientras que el sobrenadante con impurezas, fue removido completamente. El pellet fue disuelto con 100 µL de una solución 1,2 M de NaCl provista por el kit, y se aseguró su total disolución por medio del uso de un agitador de tubos. Con esto se separó el ADN de restos de péptidos y lípidos.

A esta mezcla se le adicionaron 300 µL de etanol a -20°C, y se llevó a -20°C por 10 minutos para lograr la precipitación del ADN. Se hizo una última centrifugación a 10.000 rpm por 4 minutos, se eliminó el etanol, y finalmente el pellet de ADN purificado se disolvió en 100 µL de agua libre de nucleasas.

Este ADN fue utilizado inmediatamente para realizar la prueba de PCR o bien se almacenó a 4°C por no más de un mes.

b) Mezcla de reacción

Para lograr la mezcla de amplificación del ADN purificado, se utilizó un kit 2X PCR Master Mix Fermentas®, el cual incluye a la polimerasa Termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl₂. (Tabla N°1)

TABLA 1: Contenidos del kit “2X PCR Master Mix” (Fermentas®)

Compuesto	Cantidad
Taq ADN Polimerasa (recombinante) y “buffer” de reacción	0,05 unidades/ μ L
MgCl ₂ .	4 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,4 mM cada uno

Para hacer la mezcla de reacción se utilizaron 12,5 μ L de 2X PCR Master Mix, 5 μ L de cada uno de los partidores, y 5 μ L de la muestra de ADN o Templado. Se obtuvo un volumen de 27,5 μ L, los cuales se depositaron en tubos de 0,2 ml y luego se centrifugaron a 1000 rpm por 1 minuto para así lograr que todos los reactivos decantaran al fondo del tubo, asegurando su mezcla.

c) Amplificación del ADN

El protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito por Malorny *et al.*, (2003), e incluye una denaturación inicial de 95°C por un minuto, con la que se busca una separación inicial de las hebras dobles de ADN, seguida por 37 ciclos con denaturación de 95° C por 30 segundos la cual busca la separación total de todas las hebras dobles a simples, hibridación o “annealing” de 64°C por 30 segundos con lo que los partidores se unieron a los extremos de las hebras blanco y, extensión a 72° C por 30 segundos, con lo cual se formaron las nuevas hebras con ayuda de la polimerasa termoestable. Finalmente, se hizo un periodo de extensión adicional de 72° C por 4 minutos para terminar de formar las hebras que pudiesen haber quedado incompletas.

El producto del PCR fue sometido a electroforesis para su visualización en forma inmediata, o bien se almacenó a 4°C por no más de 2 días.

d) Visualización

La visualización del producto amplificado por el PCR, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2% en “buffer” Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®), el cual se mezcló de inmediato con Bromuro de Etidio (0,5 μ g/ml)

(Fermelo®). Se tomaron 11 µL del producto de PCR, y se mezclaron con 4 µL de un producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®), el cual posee glicerol para proporcionar densidad a la muestra y azul de bromofenol para chequear el progreso de la migración de las bandas de ADN (Anexos 2 y 3). Esta se llevó a cabo a 90V por 90 minutos

Como marcador de tamaño molecular se utilizó O'Ranger Ruler 50 bp DNA ladder (Fermentas®), el cual contiene fragmentos de ADN entre 50 y 1000 pares de bases, aumentando de 50 en 50 (Anexo 4). Con este producto se comparó el tamaño de las hebras esperadas (284 pares de bases).

Al finalizar la electroforesis, las bandas fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (Transiluminator UVP®), y fotografiadas con película Polaroid®.

4.2.2 Determinación de la concentración bacteriana mínima detectable por la prueba

Para poder determinar la cantidad mínima de bacterias detectadas por la prueba de PCR implementada, se utilizaron 7 tubos de caldo RV con concentraciones al décimo de S.E que variaron entre 10^0 y 10^6 UFC/ml y un control de caldo RV sin inocular. Este fue un ensayo doble ciego, repetido tres veces.

Las diferentes concentraciones bacterianas fueron procesadas siguiendo el protocolo ya descrito en la etapa de la implementación.

4.3 ETAPA 2: Detectar *Salmonella* Enteritidis en muestras de tejidos de pollos experimentalmente infectados, mediante PCR convencional.

Debido a que se trabajó con una cepa zoonótica, a lo largo de toda esta etapa se tomaron las medidas de bioseguridad descritas posteriormente en el punto 4.4.

4.3.1 Detección de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* en tejidos de pollos experimentalmente infectados, positivos al cultivo bacteriológico.

La detección de S.E por medio de PCR en animales experimentalmente infectados se realizó en 53 muestras de tejidos, (32 de intestino y 21 de “pool” de órganos) positivas al cultivo bacteriológico, que correspondían al total de muestras positivas obtenidas del Proyecto FONDECYT 1060569. Como controles se utilizaron caldo RV incubado por 24 horas a 37°C, inoculados con *Proteus* spp (control negativo) y S.E (control positivo). Además se usó 6 muestras de los tejidos (4 intestinos y 2 pool de órganos) de pollos SPF como controles del efecto de la matriz en la prueba.

4.3.2 Detección de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r*, en tejidos de pollos experimentalmente infectados, negativos al cultivo bacteriológico.

Se analizaron todas las muestras negativas por cultivo tradicional de los pollos SPF, experimentalmente infectados que resultaron de la experiencia FONDECYT 1060569. En total se analizaron 126 muestras (50 de intestino y 76 de "pool de órganos") las cuales fueron incubadas en bolsas con caldo RV por 48 horas a 37°C. Como controles negativos y positivos se utilizaron los descritos en el punto 4.3.1

4.4. Normas de bioseguridad en el laboratorio

El trabajo con *Salmonella* Enteritidis requiere un nivel de bioseguridad número 2 (CDC, 1999). De este modo para prevenir una posible contaminación se utilizó delantal y guantes desechables sin polvo, y alcohol yodado para la desinfección de mesones y manos. Todo 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, se utilizó una biocámara con luz ultravioleta para mantener la esterilidad y evitar la contaminación de los reactivos. Los geles de electroforesis, los cuales poseían Bromuro de Etidio que es una sustancia fuertemente irritante y mutagénica, fueron incinerados, y manipulados de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook *et al* (1989).

5. RESULTADOS

5.1. ETAPA 1: Establecer la técnica de PCR convencional para la detección de *Salmonella* Enteritidis.

5.1.1 Implementación PCR convencional para la detección de *Salmonella* Enteritidis:

Al realizar el PCR de acuerdo al protocolo de Malorny *et al* (2003) con 37 ciclos, en muestras de caldo RV inoculado con *S.E nal^r rif^r* e incubado por 24 horas a 37°C, se logró amplificar la secuencia blanco buscada: el gen *invA*. Dichas muestras poseían altas concentraciones bacterianas (3×10^8 ; mayor al tubo N°1 del Nefelómetro de McFarland,). Las bandas obtenidas poseían un peso molecular de alrededor a 284 pares de bases, y se observaron nítidas y gruesas (Figura 1). Se obtuvo una sola banda por carril, sin que se produjeran amplificaciones inespecíficas.

El caldo RV que no fue inoculado con bacterias, pero si incubado en una estufa a 37°C por 24 horas, no obtuvo bandas de amplificación. Lo mismo ocurrió con las cepas de *E. coli* y *Proteus spp* (17 y 8 respectivamente) que fueron inoculadas en caldo e incubadas de la misma forma que la cepa de S.E (Figura 1).

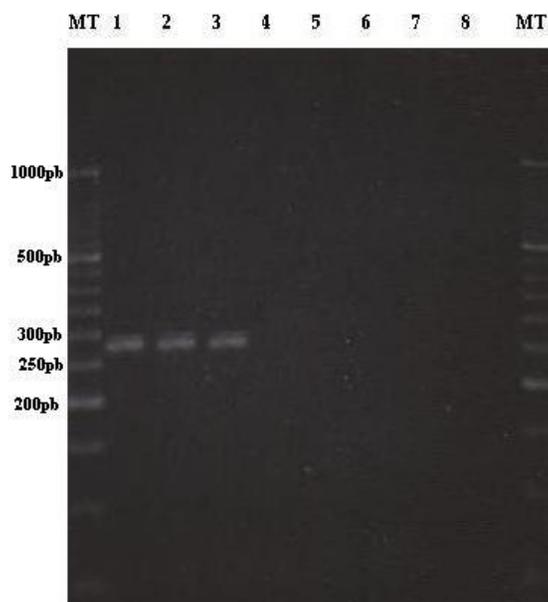


Figura 1: Implementación PCR convencional. MT: marcadores de tamaño; Línea 1, 2 y 3: *Salmonella* Enteritidis; Línea 4: *E. coli*; Línea 5: *Proteus spp*; Línea 6: Caldo RV sin inóculo. Líneas 7 y 8: Sin carga

5.1.2 Determinación de la concentración bacteriana mínima detectable por la prueba

Al hacer la prueba de PCR en caldo RV con concentraciones al décimo de S. E que fluctuaron entre las 10^0 a 10^6 UFC/ml, se obtuvieron bandas ubicadas entre los 250 y 300 pares de bases (alrededor a 284) hasta la concentración de 10^1 UFC/ml (Figura 2)

A medida que la concentración bacteriana disminuyó, tanto el grosor como la nitidez de las bandas se hicieron cada vez más bajas. A concentraciones $\leq 10^3$ UFC/ml, se presentaron bandas con estas características, pero que son perfectamente visibles a simple vista (Figura 2).

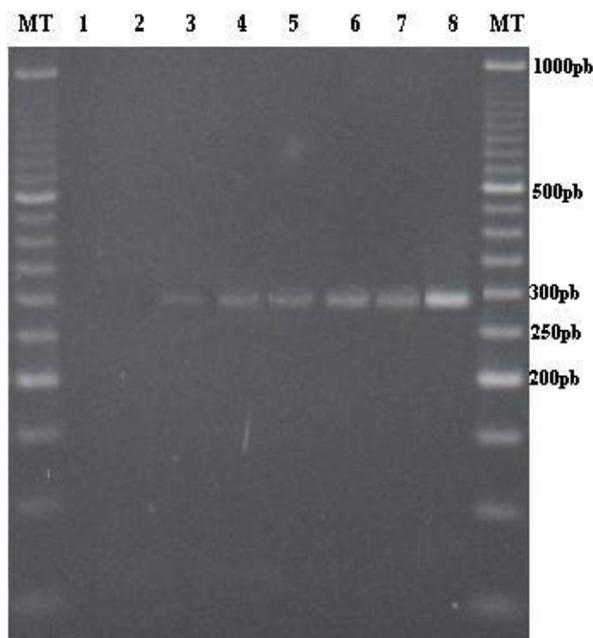


Figura 2: Determinación de la concentración mínima detectable por la prueba de PCR. MT: marcadores de tamaño; Línea 1: Caldo RV sin inocular; Línea 2: 10^0 UFC; Línea 3: 10^1 UFC; Línea 4; 10^2 UFC; Línea 5: 10^3 UFC; Línea 6: 10^4 UFC; Línea 7: 10^5 UFC; Línea 8: 10^6 UFC.

5.2 ETAPA 2: Detectar *Salmonella* Enteritidis en muestras de tejidos de pollos experimentalmente infectados, mediante PCR convencional.

5.2.1 Detección de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* en tejidos de pollos experimentalmente infectados, positivos al cultivo bacteriológico.

Las 53 muestras de tejidos de pollos infectados con *Salmonella* Enteritidis (32 de intestino y 21 de pool de órganos), que resultaron positivos al cultivo bacteriológico, presentaron banda de amplificación de aproximadamente 284 pares de bases, que también estuvo presente en el control positivo, mientras que los controles negativo y de matriz no presentaron amplificación alguna.

5.2.2 Detección de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r*, en tejidos de pollos experimentalmente infectados, negativos al cultivo bacteriológico.

Del total de muestras (126) que fueron negativas al cultivo bacteriológico, 6 presentaron amplificación del gen *invA*, correspondiendo 3 a intestino y 3 a órganos (Tabla 2). No hubo amplificaciones en los controles negativos.

TABLA 2: Detección de S.E, en tejidos de pollos experimentalmente infectados negativos al cultivo bacteriológico, según muestra.

Tipo Muestra	Cantidad muestras	PCR positivo	PCR negativo
Intestino	50	3 (6,0%)	47 (94,0%)
Órgano	76	3 (3.9%)	73 (96.1%)
Totales	126	6 (4.8%)	120 (95.2%)

6. DISCUSIÓN

La salmonelosis es una de las causas más comunes de enfermedad gastrointestinal causada por alimentos, y en nuestro país *Salmonella* Enteritidis (S.E) es el principal serotipo involucrado. Estas infecciones son zoonóticas y transmitidas al hombre por medio de alimentos de origen animal, y dentro de éstos, una importante fuente de infección son los productos provenientes de la industria avícola (Alexandre *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2002).

Debido a ésto, la industria de las aves lleva a cabo estrictos programas de control y prevención para evitar la propagación de la enfermedad, que además de provocar un serio problema de salud pública, causa grandes pérdidas económicas a los productores. Dentro de estas medidas, se encuentra el uso rutinario de métodos diagnósticos para detectar la bacteria dentro de los planteles, y así evitar la salida de productos contaminados al mercado. Idealmente dichas técnicas diagnósticas deben poseer alta sensibilidad y especificidad, poseer la capacidad de procesar un gran número de muestras en poco tiempo y ser de bajo costo para los productores.

El método tradicional, utilizado internacionalmente para la detección de *Salmonella* spp en muestras tanto clínicas, como ambientales y alimenticias, es el cultivo bacteriológico seguido de confirmación bioquímica y serológica. Si bien esta técnica posee una sensibilidad y especificidad apropiada, presenta limitaciones importantes, siendo la principal el prolongado tiempo que toma la ejecución de la prueba y por lo tanto la entrega de resultados (4 a 7 días). Por otra parte, su sensibilidad disminuye al existir células no viables en la muestra o por baja carga inicial de bacterias (Shrank *et al.*, 2001; Whyte *et al.*, 2002). Es por esto que la búsqueda de metodologías más rápidas, pero de alta sensibilidad y especificidad que sean complementarias a la prueba tradicional, es cada vez más importante.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es hoy en día, una de las metodologías más rápidas para la detección de patógenos. Además de poseer una elevada sensibilidad y especificidad, presenta la posibilidad de procesar un gran número de

muestras al mismo tiempo (Shrank *et al.*, 2001; Velilla *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, es que esta prueba está siendo cada vez más utilizada en la industria avícola para detectar *Salmonella* spp desde distintas muestras, como heces, carne, alimento, cama y órganos, entre otros, presentando sensibilidades incluso mayores que las del cultivo bacteriológico tradicional (Shrank *et al.*, 2001; Whyte *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003). Esto se debe principalmente a que el PCR, al buscar el material genético de la bacteria, es capaz de detectar células dañadas o no viables al contrario del cultivo tradicional. Además de esto la técnica molecular puede detectar *Salmonella* spp en muestras de individuos portadores los cuales eliminan a este microorganismo en forma periódica y en bajo número y también en muestras con antibióticos y microorganismos contaminantes que pueden inhibir el crecimiento de la bacteria (Stone *et al.*, 1994; Gonzáles y Rojas, 2005).

El objetivo de esta memoria de título, fue implementar el diagnóstico molecular de S.E, por medio de la técnica de PCR, para complementar al cultivo bacteriológico como metodología de detección de esta bacteria en muestras de tejidos y contenido intestinal de pollos. Para esto, en una primera etapa, se trabajó con una cepa de S.E resistente a rifampicina y ácido nalidíxico (*nal^r rif^r*) inoculada e incubada en caldo Rappaport Vassiliadis (RV) por 24 horas a 37°C y se utilizaron los partidores y metodología descritos por Malorny *et al* (2003), quienes llevaron a cabo un estudio de validación del PCR convencional como metodología diagnóstica de *Salmonella* spp en Europa. Dicho protocolo fue reproducido por 16 laboratorios internacionales, presentando en 15 de los 16 casos una fuerte concordancia entre sus resultados y los del estudio original. El laboratorio restante si bien no presentó el alto nivel de concordancia de los otros laboratorios, presentó concordancia de resultados de todas formas, aunque en menor grado.

En esta memoria de título, siguiendo el protocolo propuesto por Malorny *et al* (2003), se obtuvo bandas de amplificación de aproximadamente 284 pares de bases correspondientes a la secuencia blanco buscada del gen *invA* de S.E en todas las muestras de caldo RV inoculadas con la bacteria. Por otra parte, no se obtuvo bandas de amplificación en los controles negativos, los cuales consistieron en 8 cepas de *Proteus spp*, y 17 de *E. coli*, incubadas en caldo RV de la misma manera que la cepa de S.E, ni tampoco

en la muestra de caldo RV sin inóculo bacteriano. Con esto se confirmó que los partidores escogidos son altamente específicos para *Salmonella* spp, ya que no amplifican genes de otras enterobacterias que están cercanamente relacionadas con ésta, y tampoco interactúan con moléculas inespecíficas que pudieran estar presentes en la matriz, representada en este caso por caldo RV.

El gen *invA* es ampliamente utilizado como secuencia blanco en la detección de *Salmonella* spp mediante la prueba de PCR (Stone *et al.*, 1994; Shrank *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003; Löfström *et al.*, 2004). Este gen está presente en la mayoría, sino en todas, las cepas virulentas de este microorganismo, puesto que es uno de los encargados de codificar proteínas bacterianas que son parte importante en el proceso de invasión celular de la bacteria al hospedero. La ausencia de este gen en el género *Salmonella* es rara, y determinaría la incapacidad de la bacteria para invadir tejidos, o bien, que lo hace por un modo alternativo (Galán y Curtis, 1991).

Malorny *et al* (2003) en su estudio de validación del PCR como prueba diagnóstica de *Salmonella* spp, lograron amplificar el gen *invA* a partir de 241 cepas de *Salmonella*, siendo 30 de éstas S.E, sólo fallando en detectar el serotipo Saintpaul. Ellos sugieren que este serotipo no sería invasivo, al contrario de S.E cuya capacidad de invadir tejidos ha sido ampliamente documentada (Nagaraja *et al.*, 1991; Desmidt *et al.*, 1996; Revolledo *et al.*, 2006). A su vez, Löfström *et al* (2004) utilizaron los mismos partidores para detectar el gen *invA* en 101 cepas de *Salmonella*, de las cuales 5 eran S.E, y obtuvieron amplificación en todos los casos, mientras que esto no ocurrió en ninguna de las 43 cepas no-*Salmonella*. Finalmente, Stone *et al* (1994), utilizaron los ya nombrados partidores en 47 cepas de *Salmonella* (3 de S.E) y en 53 no-*Salmonella*, logrando amplificación en todas las ocasiones en el primer caso, y en ninguna en el segundo.

Como ya se mencionó anteriormente, la cepa de S.E utilizada en esta memoria de título, poseía una mutación genética espontánea, la cual la hacía resistente a dos antibióticos (ácido nalidíxico y rifampicina). Dichas mutaciones ocurren en la gran mayoría de los casos en el gen *RpoB*, en el caso de la rifampicina (Björkman *et al.*, 1998), y en el

gen *gyrA* en el caso del ácido nalidíxico (Hakamen *et al.*, 2005). Por este motivo es que dichas mutaciones no podrían haber afectado el proceso de amplificación de la secuencia blanco del gen *invA* utilizado en este trabajo, ya que éstas ocurren en genes totalmente distintos al que se buscó amplificar.

Wilson (1997) advierte acerca de las distintas sustancias inhibitoras que pueden provocar fallas de amplificación, o bien sustancias contaminantes que producen amplificaciones inespecíficas. Es por esto que recomienda especial cuidado en el laboratorio para evitar contaminación de las muestras. Al realizarse la prueba de PCR en el laboratorio, se tomaron medidas precautorias tendientes a evitar estas situaciones como utilizar guantes sin talco, ya que está comprobado que éste produce inhibición de la polimerasa termoestable y secuestra ácidos nucleicos, pudiendo provocar errores en el diagnóstico (Wilson, 1997). Por otra parte, debido a que todas las muestras de caldo RV inoculadas con S.E obtuvieron bandas de amplificación, se puede decir que este medio de enriquecimiento no posee sustancias en su composición que causen inhibición del PCR.

De acuerdo a esta experiencia, el momento más crítico de la prueba del PCR, es cuando se realiza la mezcla de reacción. No sólo porque los volúmenes de trabajo son muy pequeños y pueden conducir a errores en las cantidades en que cada uno de los reactivos son adicionados a la mezcla, sino que también porque cualquier tipo de contaminación en esta etapa, por pequeña que sea, producirá errores en la futura amplificación, lo que se traduce en resultados erróneos, o al menos, confusos. Para eliminar estos problemas, se recomienda ceñirse a rigurosas prácticas de laboratorio, como utilizar pipetas calibradas, instrumentos de trabajo en buen estado, evitar la presencia de polvo, y utilizar reactivos y enzimas cuya calidad esté certificada y garantizada por el laboratorio proveedor (Wolcott, 1992; Powledge, 2004).

En el caso de este trabajo, las medidas que se tomaron para disminuir al máximo el riesgo de contaminación, fueron en primer lugar utilizar un sector cerrado y exclusivo para realizar la mezcla de los reactivos a utilizar en el PCR, para así evitar que las muestras pudieran contaminarse con ADN extraño de partículas que existieran en el laboratorio.

Además, la mezcla de reacción se llevó a cabo en una biocámara con luz ultravioleta que mantiene la esterilidad del sector. Para disminuir los errores causados por el pipeteo, se decidió utilizar un kit (2X PCR Master Mix Fermentas®), el cual incluye el “buffer” de reacción, MgCl₂, los dNTPs, y la polimerasa termoestable, la cual no sufrió ningún tipo de alteración por los cambios de temperatura ocurridos dentro del termociclador, ni tampoco se vió afectada por las continuas congelaciones y descongelaciones a las que fue sometida cada vez que fue almacenada. Gracias al uso de este kit se redujo el número de pipeteos que se debían llevar a cabo para obtener la mezcla, teniendo que agregarse solamente los partidores y la muestra.

Si bien las condiciones de amplificación utilizadas en este trabajo son las descritas por el trabajo de Malorny *et al* (2003), se hizo una modificación en el número de ciclos señalado en el protocolo. En el trabajo original, los autores utilizan 35 ciclos para lograr la amplificación del gen *invA*, mientras que en esta memoria de título el número de ciclos fue aumentado a 37. La razón de este cambio fue que al realizar solamente 35 ciclos, las bandas obtenidas en la electroforesis, eran delgadas y en algunos casos poco nítidas, especialmente cuando las concentraciones bacterianas en la muestra eran bajas. Al aumentar el número de ciclos a 37, se logró incrementar la cantidad de material genético amplificado, y por lo tanto alcanzar una mejor visualización del producto. Al realizar una mayor cantidad de ciclos (38 y 39) no se obtuvieron mejores resultados. Una posible explicación de esto último es que la polimerasa termoestable y sus cofactores, junto a los partidores y dNTPs, se habrían agotado y ya no habrían estado disponibles para realizar un mayor número de copias de la secuencia blanco. Por otra parte, Malorny *et al* (2003), describen que al realizar 38 ciclos obtuvieron amplificaciones inespecíficas muy leves en las cepas de *E. coli* y *Citrobacter feundii*, pero que eran claramente diferenciables de los de *Salmonella*. Sin embargo, en el presente trabajo, a pesar de utilizar 37 ciclos (2 más de los recomendados por los autores) no se presentaron amplificaciones inespecíficas en ninguna de las cepas no *Salmonella* utilizadas como controles negativos (17 cepas *E. coli* y 8 cepas *Proteus spp*).

A menudo se describe a la electroforesis en gel como un método de visualización lento y laborioso. Sin embargo, en esta experiencia, no sólo fue una metodología fácil de

realizar, sino que solamente tomó entre 90 y 120 minutos para ser llevada a cabo. Si bien el número de celdas en el gel (10 en este caso) limita el número de muestras que pueden ser leídas en forma simultánea, esta técnica es generalmente escogida debido a su bajo costo, y a su fácil disponibilidad en los distintos laboratorios, además de que la lectura e interpretación de resultados es bastante simple (Sambrook *et al.*, 1989; Malorny *et al.*, 2003).

Posterior a la implementación de la prueba del PCR, ésta se aplicó a diferentes muestras de caldo RV inoculadas con concentraciones de S.E que fluctuaban entre los 10^0 y 10^6 UFC/ml, y se obtuvo bandas de amplificación hasta la concentración 10^1 UFC/ml, con lo cual se determinó la cantidad mínima de bacterias que la prueba implementada era capaz de detectar *in vitro*. Esto es superior al nivel de detección alcanzado por el cultivo bacteriológico tradicional utilizado en el laboratorio en el que se realizó esta memoria de título que es 10^3 UFC/gr de muestra¹. Es importante mencionar que al realizar el protocolo original de 35 ciclos propuesto por Malorny *et al* (2003), la concentración bacteriana mínima detectable del PCR implementado también fue de 10^1 UFC/ml de muestra, pero la visualización de la banda correspondiente a esta concentración en el gel fue difícil ya que era poco nítida y muy delgada, lo cual no sólo podía inducir a un error de interpretación sino que además impedía que fuese fotografiada. Al aumentar el número de ciclos a 37, la banda correspondiente a la concentración 10^1 UFC/ml se hizo mucho más nítida y perfectamente visible.

Kwan *et al* (1995) también realizaron una implementación de PCR para detectar *Salmonella* spp, y en su estudio, en el que utilizaron concentraciones bacterianas entre 4×10^1 y 4×10^8 UFC/ml inoculadas en caldo de enriquecimiento, lograron un nivel de detección de hasta 4×10^2 UFC/ml utilizando 30 ciclos solamente. Stone *et al* (1994), por su parte, analizaron la sensibilidad del PCR utilizando cultivos puros inoculados con *Salmonella* y lograron detectar hasta 9×10^1 UFC/ml de muestra utilizando 35 ciclos. La diferencia entre los resultados de estas experiencias y los de esta memoria de título, podrían explicarse debido a que tanto en el trabajo de Kwan *et al*, como en el de Stone *et al*, no se

¹ Borie, Consuelo. 2007. [Comunicación personal]. Laboratorio Microbiología Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile

utilizaron métodos de extracción de ADN elaborados, limitándose solamente a una centrifugación a 10.000 rpm y a hervir las muestras por 10 minutos en el primer caso, y solo hervir las muestras en el segundo, mientras que en este estudio se utilizó un kit de extracción comercial (Genomic DNA Purification Kit), cuyo protocolo incluía múltiples etapas de centrifugación, aplicación de calor y lavados, además del uso de cloroformo y etanol y soluciones de lisis celular y precipitación de detritus celulares e impurezas. Experimentos han demostrado que los métodos de extracción de ADN que contienen una mayor cantidad de etapas, entregan un mejor rendimiento y mejores resultados de PCR (Wilson, 1997), aunque en general, estos procedimientos son laboriosos, y aumentan la posibilidad de contaminación de las muestras debido a la gran cantidad de pasos que tienen, además de que hacen que el tiempo total de diagnóstico sea más largo. Además, en el caso de Kwan *et al* (1995), la baja cantidad de ciclos utilizados podría haber sido un factor que disminuyera la concentración mínima de bacterias detectables en las muestras.

Es importante considerar que en esta etapa se trabajó con cultivos puros, por lo que la matriz de la muestra no poseía ni la cantidad ni la calidad de inhibidores de una muestra clínica o ambiental. Aún así, Wilson (1997) advierte que si bien existe evidencia de que se pueden obtener resultados positivos al realizar PCR en muestras de cultivos puros, sin llevar a cabo procesos de extracción y exposición de ADN, o bien sometiénolas solamente a calor, de todas formas podrían presentarse problemas de sensibilidad causados por proteínas y enzimas de las propias células bacterianas que capturan material genético impidiendo que éste pueda unirse a los partidores y a la polimerasa termoestable. El uso de calor como método de extracción de ADN, sólo logra producir lisis de las paredes celulares de las bacterias, lo que en ningún caso implica que el ADN quedará liberado y a disposición de los reactivos del PCR.

Los resultados obtenidos en este estudio con cultivos bacterianos puros, indican que la capacidad de detección bacteriana del PCR implementado es alta. Sin embargo, podría verse disminuida al utilizar muestras de tejidos y contenido intestinal de pollos, ya que éstas constituyen matrices complejas que poseen inhibidores, como la hemoglobina, sales biliares y microflora bacteriana normal que, o bien secuestran ácidos nucleicos, o actúan

sobre la polimerasa termoestable. Whyte *et al* (2002) utilizaron la prueba del PCR para detectar directamente *Salmonella* inoculada en tejidos de pollo (piel de cuello) sin que las muestras fueran sometidas a ningún tipo de procesamiento previo al PCR, y como resultado obtuvieron una capacidad de detección de 10^1 UFC/ml al utilizar piel estéril, y 10^4 UFC/ml en el caso de piel no estéril. Estas diferencias fueron atribuidas a problemas de inhibición. Por otra parte, López (2004), al comparar las sensibilidades del cultivo bacteriológico con la del PCR tiempo real para detectar *Salmonella* Typhimurium en piel de cuello de pollo no estéril inoculada con la bacteria, obtuvo un 100% de sensibilidad para la prueba tradicional, y un 34,8% para el PCR tiempo real. La gran diferencia entre las sensibilidades de ambas pruebas, fueron atribuidas por una parte a la ausencia de un método de extracción de ADN, y por otra a que no se usó enriquecimiento selectivo de las muestras.

Es por eso que en esta memoria de título, para contrarrestar los posibles problemas de sensibilidad causados por los inhibidores, al hacer la prueba en muestras de matrices complejas, éstas se incubaron en caldo de enriquecimiento selectivo (RV), el cual no sólo diluye los inhibidores, sino que también favorece la multiplicación de *Salmonella*, lo cual incrementa el número de bacterias en la muestra, al mismo tiempo que retarda el desarrollo de bacterias no deseadas (Koneman *et al.*, 1986; Wilson, 1997; Löfström *et al.*, 2003). Además, el uso de un método de extracción complejo y de variadas etapas, también habría contribuido a que la capacidad de detección de nuestra prueba fuese poco afectada por los inhibidores cuando fue llevada a cabo en muestras de tejidos y contenido intestinal de pollo.

Al realizar la prueba de PCR implementada en 53 muestras de tejidos de pollos inoculados con S.E (32 de intestino y 21 de pool de órganos) y que fueron positivas al cultivo bacteriológico, se observó amplificación en todos los casos. Stone *et al* (1994) demostraron que el tratamiento de muestras con inhibidores y alta cantidad de microflora bacteriana (heces de perro), con caldos selectivos de enriquecimiento aumenta la sensibilidad de la prueba del PCR. Ellos analizaron muestras inoculadas con *Salmonella* spp, con y sin tratamiento de enriquecimiento. En el caso de las muestras sin enriquecer, no obtuvieron ningún tipo de amplificación, mientras que en las que si fueron inoculadas en

medios de enriquecimiento lograron detectar concentraciones de hasta 8×10^1 UFC. Por su parte, Freschi *et al* (2005) llegaron a la conclusión que la combinación de un método de extracción complejo basado en el uso de solventes orgánicos, unido a incubación de la muestras en caldo RV era la más eficiente para detectar *Salmonella* Typhimurium inoculada en heces de cerdos, al compararla con otros dos métodos de extracción (calentamiento y centrifugación, Kit comercial que incluye el uso de soluciones salinas) y otros dos medios de enriquecimiento selectivo (caldo Tetrionato y Selenito Cistina). Los autores advierten que si bien en su experiencia el caldo Tetrionato es más eficaz que el RV, es la combinación de éste último con el método de extracción de fenol cloroformo el que logra mejores resultados que cualquier otra combinación que ellos hayan analizado.

Basándose en los reportes recientemente expuestos, se puede hipotetizar que entre los motivos del éxito de la prueba implementada al detectar S.E en matrices complejas de tejidos y contenido intestinal positivas al cultivo bacteriológico, están la incubación de las muestras en caldo RV por un periodo de 48 horas a 37°C y la utilización de un complejo método de extracción de ADN bacteriano, lo cual redujo la acción de los inhibidores y por lo tanto, disminuyó el efecto de la matriz sobre la prueba. Además de que la concentración bacteriana en las muestras era probablemente de un mínimo de 10^3 UFC/gr, ya que las muestras habían resultado positivas a la prueba tradicional.

Es importante resaltar que no hubo diferencias al realizar la prueba en una matriz u otra (pool de órganos e intestino), ya que podría haberse esperado que las muestras de intestino tuvieran un efecto inhibitorio mayor que el de los órganos internos. Esto porque las muestras intestinales aparte de los inhibidores inherentes a un tejido orgánico, poseen una alta cantidad de flora bacteriana natural mucho mayor a la de los órganos internos obtenidos en forma aséptica, que no debiesen presentar una mayor cantidad de bacterias. Sin embargo, se ve que en ambos casos todas las muestras utilizadas para llevar a cabo la prueba del PCR resultaron positivas, sin presentarse casos negativos cuya explicación probable hubiese sido la inhibición de uno o más pasos del diagnóstico.

En general, las matrices más complejas para llevar a cabo el PCR son las de alimentos y aquellas que posean una gran cantidad de flora bacteriana, como lo son las heces y muestras ambientales, como aguas estancadas o cama de galpones de crianza (Stone *et al.*, 1994; Wilson, 1997; Löfström *et al.*, 2003). En el caso de los alimentos, el problema se da principalmente por la presencia de inhibidores que secuestran ácidos nucleicos e inactivan la polimerasa termoestable como lo son las grasas, el glicógeno, proteínas, Ca^{++} , entre otros. Además los procesos de conservación a los que muchos alimentos son sometidos también repercuten en los resultados de la prueba del PCR (Wilson, 1997; Löfström *et al.*, 2003). En el caso de las muestras de heces, la inhibición se da tanto por la presencia de inhibidores, principalmente bilirrubina y sales biliares (Stone *et al.*, 1994; Pathmanathan *et al.*, 2003), como por la presencia de microflora bacteriana intestinal, además de otros microorganismos que pudiesen haber sido adquiridos desde el ambiente luego de la defecación, los cuales compiten con *Salmonella* inhibiendo su crecimiento y además producen enzimas y productos metabólicos que actúan como inhibidores del PCR (Stone *et al.*, 1994; Wilson, 1997)

A pesar de que en este trabajo hubo un 100% de concordancia entre los resultados positivos arrojados por el cultivo bacteriológico y la prueba de PCR, al realizar esta última en muestras positivas a la prueba tradicional, existen ocasiones en que el cultivo bacteriológico arroja resultados positivos y no así el PCR. Whyte *et al* (2002) realizaron ambas pruebas en 198 muestras de piel de cuello de pollo broiler comercial de planteles en monitoreo para *Salmonella*, y obtuvieron 38 muestras positivas con la prueba del PCR, y 32 por el cultivo bacteriológico tradicional, donde 7 de ellas fueron negativos al PCR. Cuando se combinaron los resultados de las dos pruebas, el número de muestras positivas aumentó a 45. Es por esto que tanto en este trabajo como en otros, se propone al PCR como una técnica complementaria a la técnica del cultivo tradicional, y no como un método que lo sustituya.

En esta memoria de título, aparte de las muestras de pollos inoculados con S.E, se hizo PCR en tejidos de pollos sanos (4 intestinos y 2 órganos internos), sin inocular. No se obtuvo amplificación en ninguna de estas muestras, lo cual una vez más reafirma la

especificidad de los partidores, ya que no ocurren amplificaciones inespecíficas provocadas por la unión de éstos a ADN propio del animal, o de otros microorganismos que pudieran formar parte de la flora bacteriana normal de los pollos.

La última etapa de este trabajo consistió en realizar la prueba de PCR implementada en 126 muestras (50 de intestino y 76 de “pool” de órganos) de pollos inoculados con S.E que resultaron negativas al cultivo bacteriológico tradicional. Como resultados se obtuvo amplificación sólo en 6 muestras del total, siendo 3 de estas muestras de intestinos y 3 de órganos internos. Esto demuestra que el cultivo bacteriológico en agar XLD utilizando muestras incubadas en caldo RV por 48 y 72 horas a 37°C tiene una buena sensibilidad, y reafirma que el PCR debe ser un complemento diagnóstico y no un sustituto.

Existen distintas razones que pueden explicar los resultados positivos para la prueba del PCR, en muestras que aparecen negativas al cultivo bacteriológico tradicional. Una de ellas es la mayor sensibilidad que el diagnóstico molecular tendría en comparación con la prueba clásica de aislamiento. Oliveira *et al* (2002) compararon la sensibilidad de las dos técnicas utilizando 87 muestras de la industria avícola (cama, vísceras, carne). Como resultados obtuvieron 33 muestras positivas (37,9%) para la prueba del PCR y sólo 15 (17,2%) para el cultivo bacteriológico. Además de las diferencias en las sensibilidades, todas las muestras que resultaron positivas al cultivo, también lo fueron para el PCR. El método bacteriológico utilizado por ellos, consistía en incubación en caldo de pre enriquecimiento por 18 - 24 horas a 37°C y posteriormente incubación en caldo de enriquecimiento por 24 horas a 37 - 42°C. Luego de éste periodo se sembraron las muestras en agar verde brillante y se incubaron a 37°C por 24 horas. Podría hipotetizarse que el periodo de pre enriquecimiento, el cual es utilizado principalmente en muestras de alimentos, actuó como un factor de dilución bacteriana extra, y además incrementó la cantidad de microflora bacteriana no *Salmonella*, a pesar del periodo de enriquecimiento posterior en que se favoreció el crecimiento sólo de esta bacteria. Esto podría haber disminuido de alguna forma la sensibilidad del cultivo bacteriológico utilizado. Por su parte Shrank *et al* (2001), quienes hicieron la comparación entre las sensibilidades de las dos pruebas analizando muestras de pollos sacrificados a las 48 horas y a los 7 días luego de

haber sido inoculados con S.E, en el caso de los animales sacrificados a las 48 horas, obtuvieron una sensibilidad de un 75% para el PCR, y de un 25% para el cultivo bacteriológico, mientras que en las aves sacrificadas a los 7 días, la sensibilidad del PCR aumentó a un 91,6% y la del cultivo a 75%. En este caso la prueba tradicional sólo incluyó enriquecimiento selectivo en caldo tetracionato por 24 horas a 37°C, y luego siembra en placas. Stone *et al* (1994) describieron al caldo tetracionato como inhibidor del crecimiento de *Salmonella*, sin embargo Shrank *et al* (2003) en el mismo trabajo recién descrito, comprobaron que esto no era así, pudiendo detectar *Salmonella* desde tejidos de pollos experimentalmente infectados con sólo 6 horas de enriquecimiento en caldo tetracionato, comparado a las 10 horas que tomó con caldo Selenito Cistina, que es el recomendado por Stone *et al*.

En este trabajo se estableció que la concentración bacteriana mínima detectable era de 10^1 UFC/ml, mientras que la sensibilidad del cultivo bacteriológico utilizado es de 10^3 UFC/ml (Borie, 2007)¹. De esta forma, las 6 muestras positivas a la prueba del PCR implementada obtenidas desde 126 muestras negativas al aislamiento podrían explicarse por la diferencia en las sensibilidades de ambas pruebas. Así, puede hipotetizarse que las 6 muestras positivas a PCR tendrían concentraciones bacterianas menores a 10^3 UFC/ml, pero mayores a 10^1 UFC/ml, y por lo tanto sólo pudieron ser detectadas por el diagnóstico molecular, no así por el cultivo bacteriológico. Cabe hacer notar que más allá de esta diferencia de 6 muestras positivas por PCR, la prueba de cultivo bacteriológico realizada demostró ser altamente confiable y eficiente para detectar S.E desde muestras de intestino y tejidos de pollos.

Otra posible explicación para la obtención de resultados positivos en la prueba del PCR, desde muestras negativas al cultivo bacteriológico, es que la prueba tradicional no puede identificar células no viables o muertas (González y Rojas, 2005), mientras que el PCR sí puede hacerlo, ya que es una prueba que sólo requiere de la presencia del material genético de una bacteria, sin necesitar otras características como capacidad de crecimiento, utilización de sustratos o unión específica a anticuerpos (Wolcott, 1992). Si bien esta situación es considerada una ventaja en términos de poder identificar la presencia de un

microorganismo sin importar su viabilidad, también se considera una desventaja, especialmente desde el punto de vista de la industria de los alimentos, donde la viabilidad de un microorganismo determina su salida al mercado. Por otra parte el PCR al no llevar a cabo un aislamiento de bacterias vivas, no permite realizar pruebas serológicas y bioquímicas, ni de susceptibilidad a antimicrobianos, las cuales son cada día más requeridas (Kulkarni *et al.*, 2002).

Probablemente, la principal ventaja que se le reconoce al PCR con respecto al cultivo bacteriológico, es la rapidez con que entrega sus resultados. Esto es importante desde el punto de vista económico, ya que mientras no se tenga seguridad de que un producto alimenticio no está contaminado, éste no puede salir al mercado, o bien el productor debe arriesgarse a multas o a la confiscación de sus productos si es que *Salmonella* spp es detectada en éstos en forma posterior a su salida del plantel o del matadero.

El tiempo que tome llevar a cabo la prueba del PCR, depende del protocolo que se siga, variando entre sólo unas horas, hasta dos o tres días (Velilla *et al.*, 2004). Así, éste dependerá principalmente de si se realiza o no enriquecimiento de las muestras, y de hacerse por cuanto tiempo, y de la utilización o no de un método de extracción, y lo laborioso que éste resulte. Oliveira *et al* (2003) obtuvieron resultados con una diferencia de hasta 5 días al utilizar ambos métodos para detectar *Salmonella* en muestras de pollos, utilizando pre enriquecimiento y enriquecimiento selectivo por 18 a 24 horas en ambos casos, y un complejo procedimiento de extracción de ADN basado en la utilización de fenol y cloroformo al realizar el PCR. Ferreti *et al* (2001) desarrollaron un protocolo de PCR convencional de sólo 12 horas para detectar *Salmonella* spp en alimentos, el cual incluye la incubación de las muestras en agua peptonada fosfatada por 6 horas, y el uso de un método de extracción que combina la utilización de una solución de proteinasa K para lograr la lisis celular, con centrifugaciones repetidas para eliminar los inhibidores. Esto es un tiempo mucho menor que el que lleva ejecutar cualquier protocolo de cultivo bacteriológico que en el mejor de los casos podría tomar 48 horas en obtener con certeza colonias puras de *Salmonella* (Stone *et al.*, 1994).

En este trabajo, al realizar el PCR en muestras de tejidos y contenido intestinal de pollos, se utilizaron muestras que habían sido inoculadas en caldo RV por 48 horas a 37°C, debido a que se usaron las mismas muestras que anteriormente habían sido analizadas por cultivo bacteriológico para detectar S.E. El proceso del PCR a partir de estas muestras ya enriquecidas tomó entre 5 a 6 horas aproximadamente, considerando el proceso de extracción de ADN de una hora y media a 2 horas, una hora y 40 minutos de amplificación en el termociclador y la electroforesis de una hora y media. Así, se puede decir que tomando en consideración el tiempo de incubación de las muestras, los resultados se obtuvieron en 3 días, que pueden ser disminuidos hasta en 24 horas si es que se reduce el tiempo de enriquecimiento en caldo, mientras que el cultivo bacteriológico, unido a las pruebas bioquímicas y serológicas de identificación lleva de 4 a 7 días (Whyte *et al.*, 2002).

Finalmente, se puede afirmar que la técnica de PCR convencional implementada en cultivos puros utilizando partidores específicos que detectan el gen *invA*, para identificar S.E en muestras de tejidos y contenido intestinal de pollos, demostró ser una prueba rápida y eficiente, cuyos resultados fueron muy similares al cultivo bacteriológico detectando algunas muestras positivas adicionales. Dicha eficiencia se obtuvo por medio de la combinación de un periodo de incubación de muestras en caldo de enriquecimiento y la utilización de un complejo método de extracción de ADN, lo cual contrarrestó la posible presencia de inhibidores en las muestras de tejidos.

7. CONCLUSIONES

1.- Se implementó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para la detección de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal de pollos mediante la técnica de Malorny *et al* (2003) modificada.

2.- La concentración bacteriana mínima detectable por la prueba de PCR fue de 10^1 UFC/ml, y no se presentó amplificación en ninguna de las muestras de 25 cepas de Enterobacteriaceae no-*Salmonella* utilizadas como controles negativos.

3.- El procesamiento de matrices tisulares y de contenido intestinal (matrices complejas) incubados en caldo Rappaport Vassiliadis por 48 horas a 37°C no evidenció presencia de inhibidores para la prueba de PCR.

4.- El PCR presentó una mayor eficiencia de detección que el cultivo bacteriológico tradicional, ya que fue capaz de detectar 6 muestras positivas, de 126 negativas al cultivo, aportando un 4,8% más de muestras positivas.

8. BIBLIOGRAFÍA

ALEXANDRE, M., POZO, C., GONZALEZ, V., MARTÍNEZ, M. C., PRAT, S., FERNÁNDEZ, A., FICA, A., FERNÁNDEZ, J., HEITMANN, G. 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.

BANWART, G.J., AYRES, J. C. 1953. Effect of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. *Applied Microbiology*. 1: 296-301.

BJÖRKMAN, J., HUGHES, D., ANDERSSON, D. I. 1998. Virulence of Antibiotic-resistant *Salmonella Typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95: 3949 – 3953.

BLACKBURN, C. D. 1993 Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in food. *Journals of Applied Bacteriology*. 75:199-214.

BLIVET, D., SALVAT, G., HUMBERT, F., COLIN, P. 1998. Development of a new culture medium for rapid detection of *Salmonella* by indirect conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 399-403.

BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. 2000 Guest Commentary. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(7): 2465–2467.

CADY, P., DUFOUR, S. W., SHAW, J., KRAEGER, S. J. 1978. Electrical Impedance Measurement: Rapid Method for Detecting and Monitoring Microorganisms. *Journals of Clinical Microbiology*. 7(3): 265–272.

CALDWELL, W. J., STULBERG, C. S., PETERSON, W. D. Jr. 1966. Somatic and Flagellar Immunofluorescence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*. 92(4): 1177-1187.

CAMPBELL, M.A. 2002. Nested Primers for PCR. [Online] <<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/NestedPCR.html>> [Consulta 05-03-2007]

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 Argentina. pp: 203-214.

CARTER, G. R. 1984. Enterobacteria. **In:** *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology*. 4th ed. Charles. C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, USA. pp. 92-110.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. [Online] <<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb14/bmb14toc.htm>> [Consulta: 10 - 03 - 2007].

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2002. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Foodborne infections. [Online]. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g.htm> [consulta 16-01-2007].

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2004. National *Salmonella* Surveillance System Annual Summary, 2004. [Online]. <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/SalmonellaIntroduction2004.pdf>> [Consulta: 12 - 03 - 2004].

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2006. Foodborne Surveillance Report for 2004. [Online]. <<http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2004/Report.pdf>> [Consulta 11-03-2007].

CHAMBERS, J. R., LU, X. 2002. Probiotics and Maternal Vaccination for *Salmonella* control in broiler chickens. *Journals in Applied Poultry Research*. 11: 320 – 327.

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: 583-590.

CORTEZ, A. L. L., CARVALHO, A. C. F. B., IKUNO, A. A., BÜRGER, K. P., VIDAL – MARTINS, A. M. C. 2006. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Veterinary Science*. 81: 340-344.

COSTA, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 22(5): 88-93.

DE MEDICI, D., CROCI, L., DELIBATO, E., DI PASQUALE, S., FILETICI, E., TOTI, L. 2003. Evaluation of DNA extraction Methods for use in combination with SYBR Green I Real-Time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(6): 3456-3461.

DESMIDT, M., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. 1996. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. *Veterinary Microbiology*. 56: 99-109.

DOS SANTOS SHNEID, A., LAMEIRO RODRIGUES, K., CHEMELLO, D., TONDO, E. C., ZACCHIA AYUB, M. A., GUIMARAES ALEIXO, J. A. 2006. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of *Salmonella* in chicken meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 350-355.

- DUSCH, H., ALTWEGG, M.** 1995. Evaluation of Five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(4): 802-804.
- ECONOMIC RESEARCH SERVICE (ERS).** 2003. Economics of Foodborne Disease: *Salmonella*. [online]. <<http://www.ers.usda.gov/Briefing/FoodborneDisease/Salmonella.htm>> [consulta 16-01-2007]
- 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.
- EUROSURVEILLANCE.** 1999. *Salmonella enteritidis* en Europa occidental, 1995-98: informe de vigilancia procedente de Enter-net. *Eurosurveillance* 1999. 4(5):56-56.
- EYGOR, A., CARLI, K. T., UNAL, C. B.** 2002. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Letter in Applied Microbiology*. 34: 37 – 41.
- FERRETI, R., MANNAZZU, I., COCOLIN, L., COMI, G., CLEMENTI, F.** 2001. Twelve-hour PCR-Based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2): 977 – 978.
- FICA, A., ALEXANDRE, M., PRAT, S., FERNÁNDEZ, A., FERNÁNDEZ, J., HEITMAN, I.** 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile: Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Revista Chilena de infectología*. 18 (2): 85-93.
- FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C., NERI, M.** 1983. DNA-DNA Hybridization assay for detection of *Salmonella* spp, in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(5): 1146-1151.
- FRESCHI, C. R., DE OLIVEIRA E SILVA CARVALHO, L. F., BRUNO DE OLIVEIRA, C. J.** 2005. Comparison of DNA-extraction methods and Selective Enrichment broths on the detection of *Salmonella Typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*. 36(4): 363-367.
- GALÁN, J. E., CURTIS, R.** 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection Immunology*. 59(9): 2901-2908.
- GALÁN, J. E., GINOCCHIO, C., COSTEAS, P.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of *invA* to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology*. 174(13): 4338-4349.
- GAST, R.K.** 2000. Strategies and Programs for controlling *Salmonella enteritidis* poultry and eggs. **In:** *Memorias del VII seminario internacional de producción y patología aviar. VII Seminario Internacional Producción y patología Aviar. Valdivia. Chile. 24-26 de Mayo 2000.* pp: 29-35.

GONZALEZ, T., ROJAS, R. A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*. 47 (5): 388-390.

HANAI, K., SATAKE, M., NAKANISHI, H., VENKATESWARAN, K. 1997. Comparison of Commercially Available Kits with Standard Methods for detection of *Salmonella* strains in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2): 775-778.

HIGGINS, J. P., HIGGINS, S. E., GUENTHER, K. L., HUFF, W., DONOGHUE, A. M., HARGIS, B. M. 2005. Use of a Specific Bacteriophage Treatment to Reduce *Salmonella* in Poultry Products. *Poultry Science*. 85: 1141- 1145.

INSALATA, N. F., SHCULTE, S. J., BERMAN, J. H. 1967. Immunofluorescence Technique for detection of *Salmonella* in Various Foods. *Applied Microbiology*. 15(5): 1145-1149.

INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE ALIMENTOS Y ZONOSIS (PANALIMENTOS). 2002. ¿Qué son las enfermedades transmitidas por los alimentos?[online]<http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/ME%20%20ETA%20INPPAZ.pdf> [consulta 16-01-2007].

JENÍKOVÁ, G., PAZLAROVÁ, J., DEMNEROVÁ, K. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Internal Microbiology*. 3: 225 – 229.

JIANG, J., LARKIN, C., STEELE, M., POPPE, C., ODUMERU, A. 1998. Evaluation of Universal Preenrichment Broth for Recovery of Foodborne Pathogens from Milk and Cheese. *Journal of Dairy Science*. 81(11): 2798 – 2803.

KAFEL, S., BRYAN, F. L. 1977. Effects of Enrichment Media and Incubation Conditions on Isolating *Salmonella* from Ground-Meat Filtrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 34(3): 285-291.

KENNER, B. A., ROCKWOOD, S. W., KABLER, P. W. 1957. Isolation of Members of the genus *Salmonella* by membrane filter procedures. *Applied Microbiology*. 5: 305-307.

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 Lippincot Company, Philadelphia, USA. pp: 89-157.

KULKARNI, S.P., LEVER, S., LOGAN, J. M .J., STANLEY, J., SHAFI, M. S. 2002. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *Journals of Clinical Pathology*. 55(7): 749 – 753.

KWAN, J., LITLEDIKE, E. T., KEEN, J. E. 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 46-51.

LAMPEL, K., ORLANDI, P., KORNEGAY, L. 2000. Improved Template Preparation for PCR-based Assay for detection of Food – Borne Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10): 4539 – 4545.

LÖFSTRÖM, CH., KNUTSSON, R., ENGDAHL AXELSSON, CH., RADSTRÖM, P. 2003. Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed Sample by PCR after Culture Enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 69 – 75.

LOPEZ HENRÍQUEZ, C. 2004. Comparación de PCR tiempo real y el Cultivo bacteriológico, en la detección de *Salmonella typhimurium* desde pollos. Tesis (Título profesional de Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 73 h.

MALORNY, B., HOORFAR, J., BUNGE, C., HELMUTH, R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1): 290-296.

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

MEAD, P., SLUTKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L. F., BRESSEE, 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

MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S., PÉREZ-ROTH, E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*. 22(3): 72-80.

MURRAY , C. J., BARTON, B. 1987. Salmonellosis *Bacteriology*. **In:** Coner, L. A; Bagust, T. J. (Eds) *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*. CSIRO for 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* 2º 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.

NG, S. P., TSUI, C. O., ROBERTS, D., CHAU, P. Y., NG, M. H. 1996. Detection and Serogroup Differentiation of *Salmonella* spp. in food within 30 hours by Enrichment–Immunoassay with a T6 Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(7): 2294-2302.

OLIVEIRA, S. D., RODENBUSCH, C. R., CÉ, M. C., ROCHA, S. L. S., CANAL, C. W. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 217–221.

OLIVEIRA CARDOSO, M., REGINATO RIBEIRO, A., RUSCHEL DOS SANTOS, L., PILOTTO, F., DE MORAES, H. M. S., PIPPI SALLE, C. T., DA SILVEIRA, S. L., PINHEIRO DU NASCIMENTO, V. 2006. Antibiotic Resistance in *Salmonella enteritidis* Isolated from Broiler carcasses. 37: 368 – 371.

PARRA, M., DURANGO, J., MATLAR, S. 2002. Microbiología, Patogénesis, Epidemiología, Clínica y Diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ-CORDOBA*. 7(2): 187-200.

PATHMANATHAN, S. G., CARDONA-CASTRO, N., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M. M., CORREA-OCHOA, M. M., PUTHUCHEARY, S. D., THONG, K. L. 2003. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hila* gene. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 773-776.

PATRICK, M; ADCOCK, P; GOMEZ, T; ALTERKRUSE, S; HOLLAND, B; TAUXE, R; SWERDLOW, D. 2004. *Salmonella enteritidis* infections, United States, 1985 -1999. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (1) [online] <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no1/02-0572.htm#1>> [consulta: 16 - 01 – 2007].

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

POWLEDGE, T. M. 2004. The Polymerase Chain Reaction. *Advances in Physiology Education*. 28: 44-50

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. Periodo 1999-2000. *Revista médica de Chile*. 130(5): 495-501

PRAT, S., FERNANDEZ, A., FICA, A., FERNANDEZ, J., ALEXANDRE, M., HEITMANN, I. 2001. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 9(1): 7-12.

QUINN, C., WARD, J., GRIFFIN, M., YEARSLEY, D., EGAN, J. 1995. A comparison of conventional culture and three rapid methods for detection of *Salmonella* in poultry feeds and environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*. 20(2): 89-91.

QUIROZ, C. 1987. Transmisión de las salmonelas en las aves. *Veterinaria Tropical*. 12: 39-45.

REVOLLEDO, L., FERREIRA, A. J. P., MEAD, G. C. 2006. Prospects in *Salmonella* control: Competitive Exclusion, Probiotics, and Enhancement of Avian Intestinal Immunity. *Journals of Applied Poultry Research*. 15: 341-351.

RYCHLÍK, I., VAN KESTEREN, L., CARDOVÁ, L., SVESKTOVÁ, A., MARTÍKOVÁ, R., SISAK, F. 1999. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 269-272.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. Gel Electrophoresis of DNA. **In:** *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. pp: 6.2-6.62.

SCHINKINGER, M. 2003. Detection of *Salmonella* with de impedance method. [Online] <http://www.sylab.com/downloads/evaluate0102_en.pdf> [consulta: 25-1-2007].

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.

SMELTZER, T. I., DUNCALFE, F. 1979. Secondary selective enrichment of *Salmonella* from naturally contaminated specimens by using a Selective Motility System. *Applied and Environmental Microbiology*. 37(4): 725-728.

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.

SUN, Y. L., XU, Y. Z., CHAMBON, P. 1982. A simple and efficient method for the separation and detection of small DNA fragments by electrophoresis in formamide containing agarose gels and Southern blotting to DBM-paper. *Nucleic Acid Research*. 10(19): 5753-5763.

VAN ZIJDERVELD, F., VAN ZIJDERVELD-VAN BEMMEL, A.M., ANAKOTTA, J. 1992. Comparison of Four Different Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in Experimentally Infected Chickens. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(10): 2560-2566.

VELILLA, A., TERZOLO, H., FEINGOLD, S. 2004. Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella* PCR aplicada a la avicultura y a la microbiología de los

alimentos.[online]<<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/otras/aves/salmonella.htm>> [consulta: 16 - 01 - 2007]

VOOGT, N., RAES, M., WANNET, W. J. B., HENKEN, A. M., VAN DEN GIESSEN, A. W. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. Letters in Applied Microbiology. 32:89-92.

WEGENER, H. C., HALD, T., LO FO WONG, D., MADSEN, M., KORSGAARD, H., BAGER, F., GERNER-SMITH, P., MOLBACK, K. 2003. *Salmonella* Control Programs in Denmark. Emerging Infectious Diseases. 9(7): 774–780.

WHYTE, P., MCGILL, K., COLLINS, J.D., GORMLEY, E. 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. Veterinary Microbiology. 89: 53–60.

WILSON, I. G. 1997. Minireview: Inhibition and facilitation of Nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology. 63(10): 3741-3751.

WOLCOTT, M. J. 1992. Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods. Clinical Microbiology Reviews. 5(4): 370-386.

ZDRAGAS, A., TSAKOS, P., MAVROGENI, P. 2000. Evaluation of two assays, MSRV and RV, for the isolation of *Salmonella* spp. from wastewater samples and broiler chickens. Letters in Applied Microbiology. 31: 328-331.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Reconstitución de los partidores para la detección de *Salmonella enteritidis*

El primer partidor, poseía 32 nM, por lo que para reconstituirlo se le agregaron 320 μL de agua libre de nucleasas. Esto se denominó solución madre o stock del primer partidor. Para hacer la solución de reacción, se tomó 1 μL de la solución madre del partidor, y se diluyó en 990 μL de agua libre de nucleasas. En cada reacción de PCR se usaron 5 μL de esta solución, lo que corresponde aproximadamente a 0.5 μM del partidor.

El segundo partidor, poseía 36 nM, por lo que para reconstituirlo se le agregaron 360 μL de agua libre de nucleasas. Esto se denominó solución madre o stock del segundo partidor. Para hacer la solución de reacción, se tomó 1 μL de la solución madre del partidor, y se diluyó en 990 μL de agua libre de nucleasas. En cada reacción de PCR se usaron 5 μL de esta solución, lo que corresponde aproximadamente a 0.5 μM del partidor.

ANEXO 2: Contenido de 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®)

Compuesto	Cantidad
Tris - HCl (pH 7.6)	10 mM
EDTA	60 mM
Azul de Bromofenol	0,03%
Glicerol	60%

ANEXO 3: Contenido de 50 X TAE (Fermentas®)

Compuesto	Cantidad
Tris	40 mM
Ácido acético	20 mM
EDTA	1 mM

ANEXO 4: Composición O'Ranger Ruler 50 bp DNA Ladder (Fermentas®)

Compuesto	Cantidad
Tris -HCl (pH 7,6)	10 mM
EDTA	10 mM
Orange G	0,033%
Xylene cyanol	0,008%
Glicerol	10%