



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS DE PCR PARA EL
DIAGNÓSTICO SEROTIPO-ESPECÍFICO DE *Salmonella enterica*
serotipos Hadar y Typhimurium**

Yasna Karina Aguilera Ríos

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

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2015



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS DE PCR PARA EL
DIAGNÓSTICO SEROTIPO-ESPECÍFICO DE *Salmonella enterica*
serotipos Hadar y Typhimurium**

Yasna Karina Aguilera Ríos

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA	: Patricio Retamal
PROFESOR CORRECTOR	: Consuelo Borie
PROFESOR CORRECTOR	: Pilar Oviedo

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi madre por su dedicación, fortaleza y constancia, por todo su esfuerzo para que juntas alcanzáramos esta meta, por su confianza, por haberme hecho la mujer que soy ahora, por su amor y por ser la luz de mi vida.

A mi padre, por su constante preocupación y apoyarme siempre, por estar ahí.

A Juan Pablo, por brindarme su apoyo desde el primer día que lo conocí, por apoyarme y darme la fortaleza para lograrlo, por creer en mí y por amarme.

A mis amigas, por su apoyo incondicional y confianza, por la preocupación y por la ayuda.

A la Dra. María Ester Saldías, por su dedicación, compromiso y apoyo incondicional, por aportarme con todos sus conocimientos en la realización de este trabajo, por su constante preocupación, por creer en mí, por su paciencia y el cariño entregado.

A la Dra. Paulina Zurita, por su preocupación, por entregarme sus conocimientos, por apoyarme, por su confianza y por el cariño.

A los laboratorios de Bacteriología Pecuaria y Biotecnología del Servicio Agrícola y Ganadero Lo Aguirre, por haberme dado la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, ya que sin su ayuda y conocimientos esto no hubiera sido posible.

A todo el personal del Servicio Agrícola y Ganadero Lo Aguirre por la hospitalidad, la simpatía y el cariño, por la preocupación y su constante ayuda.

A Patricia Álvarez, por sus gestiones, por su carisma y simpatía y por su buena disponibilidad

Por último, y no menos importante, a mi profesor guía Patricio Retamal, por haberme dado la confianza para realizar este proyecto, por sus conocimientos, por su confianza y compromiso, por haberme dado esta hermosa oportunidad, por su paciencia y por la constancia para concluir con éxito este trabajo.

“En todos los asuntos humanos hay esfuerzos, y hay resultados, y la fortaleza del esfuerzo es la medida del resultado.”

James Allen

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las especies, subespecies y hábitat de <i>Salmonella</i>	2
Tabla 2. Fórmula antigénica de algunos serogrupos y serotipos de <i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i>	4
Tabla 3. Partidores usados en PCR para <i>S. Hadar</i>	13
Tabla 4. Partidores usados en PCR para <i>S. Typhimurium</i>	14
Tabla 5. Grado de concordancia entre la técnica de serotipificación y la PCR.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. PCR para la identificación de los antígenos flagelares H1 (A) y H2 (B) de <i>S. Hadar</i>	16
Figura 2. PCR para la identificación del gen STM3845 de <i>S. Typhimurium</i>	17

RESUMEN

Los serotipos de *Salmonella* tradicionalmente se han clasificado mediante métodos serológicos que determinan antígenos somáticos y flagelares específicos. Sin embargo, este método diagnóstico es caro y tarda mucho tiempo en dar un resultado ya que requiere implementar una batería de anticuerpos para detectar los más de 2.500 serotipos de *Salmonella enterica* que se han identificado. Por otra parte, la identificación molecular de los genes responsables de la expresión de antígenos flagelares son más rápidos y más sensibles que la identificación serológica. Es por esto que, en la presente memoria se implementaron pruebas de PCR para identificar *S. enterica* serotipos Typhimurium y Hadar, ambas incluidas en un plan nacional de control de *Salmonella* en establecimientos comerciales de aves.

Se analizaron 135 cepas, 50 correspondientes a *S. Typhimurium*, 50 a *S. Hadar* y 35 enterobacterias como controles negativos. Estas cepas, previamente serotipificadas en el Instituto de Salud Pública (ISP), fueron sometidas a la prueba de PCR para determinar si existen diferencias de diagnóstico entre ambas técnicas.

Del total de cepas analizadas, sólo 46 cepas de *S. Typhimurium* dieron positivas a la prueba de PCR y cuatro dieron negativas, mientras que las 50 cepas de *S. Hadar* dieron positivas a las dos pruebas de PCR. Las 35 enterobacterias dieron negativas a las 3 pruebas de PCR.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, la detección de antígenos mediante serotipificación y PCR para las cepas de *S. Typhimurium* fue menor al esperado (92%), a diferencia de lo que ocurrió con las cepas de *S. Hadar* en que hubo 100% de acuerdo entre ambas técnicas, sugiriendo que esta prueba de detección de *Salmonella* es posible reemplazarla por los métodos tradicionales de identificación y así poder acelerar el diagnóstico de esta bacteria de gran importancia para la salud pública.

Palabras claves: *Salmonella enterica*, PCR, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*.

ABSTRACT

Salmonella serotypes have been typically classified by means of serological methods determining specific flagellar and somatic antigens. However, this diagnostic method is expensive and is a time-consuming process, since a battery of antibodies is required to detect the over 2,500 serotypes of enteric *Salmonella* that have been identified. Besides, molecular identification of the genes producing the expression of flagellar antigens is faster and more sensitive, compared to serological identification. For the above, in this memoir, PCR tests were implemented to identify *S. enterica* serotypes Typhimurium and Hadar, both of them included in the national level plan for the control of *Salmonella* in poultry establishments.

135 strains were analyzed; 50 for *S. Typhimurium*, 50 to *S. Hadar* and 35 enterobacteriaceae as negative controls. These strains, previously serotyped in the Public Health Institute (ISP), were tested by PCR to determine if any diagnostic difference might arise between both techniques.

Out of all the analyzed strains, only 46 *S. Typhimurium* strains resulted positive and four negative, while the 50 *S. Hadar* strains were positive when tested with PCR. The 35 enterobacteriaceae resulted negative when tested by PCR.

Based on the results of the study, detection of antigens by means of serotyping and PCR for *S. Typhimurium* strains, was below the expectations (92%), differently to results of *S. Hadar* strains, where the result was 100% of coincidence between both techniques, thus suggesting that this *Salmonella* detection test is possible to be replaced by the traditional identification methods, consequently allowing to speed up the diagnosis for this highly important bacteria concerning public health.

Key words: *Salmonella enterica*, PCR, serological methods, molecular methods, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*.

INTRODUCCIÓN

Las Salmonelosis no tifoidales son una de las principales causas bacterianas de gastroenteritis de origen alimentario, causada por microorganismos del género *Salmonella*.

En la mayoría de las especies de animales de consumo, este patógeno se establece como una infección clínicamente inaparente de duración variable, transformándose en un potencial riesgo de zoonosis. Es por esto que ha habido una creciente preocupación en la prevención y control de esta enfermedad, debido a que es la principal fuente de brotes transmitidos por alimentos en humanos.

La incidencia de *Salmonella* en general ha tenido un dramático y continuo aumento de brotes en humanos, a diferencia de lo que ha ocurrido en la Unión Europea, donde se registra una disminución a la mitad de los casos en los últimos años. Este es el resultado de una estricta política de vigilancia y control de la bacteria, que ha implicado un gran esfuerzo dentro de los países miembros en la prevención.

Existen más de 2.500 serotipos de *Salmonella* registrados, pero la Comisión Europea observó que los serotipos más comúnmente aislados son *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar* y *S. Virchow*.

Debido a la importancia de *Salmonella*, la Unión Europea el 2003 estableció el Reglamento (CE) n° 2160/2003 sobre el control de esta bacteria y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Este reglamento obliga a adoptar medidas apropiadas y eficaces para detectar y controlar la presencia de *Salmonella* en la producción animal, con el fin de disminuir su prevalencia y el riesgo que implica para la salud pública.

Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas de diagnóstico rápidas y prácticas que permitan identificar la bacteria desde diferentes tipos de muestras, por lo que en este trabajo se implementarán tres métodos de PCR para identificar 2 serotipos comunes de *S. enterica*: *S. Hadar* y *S. Typhimurium*, ambos pertenecientes al programa de control de *Salmonella spp.* en establecimientos comerciales de aves.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Clasificación

El género *Salmonella* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase γ -*Proteobacteria*, y recibe el nombre del veterinario estadounidense Daniel Elmer Salmon, quien aisló por primera vez *Salmonella enterica* serotipo *Choleraesuis* desde cerdos en 1885 (Koneman *et al.*, 2008).

De acuerdo al sistema CDC (Center for Disease Control and Prevention), existen dos especies de *Salmonella*: *S. enterica*, que comprende seis subespecies identificadas, y *S. bongori* (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las especies, subespecies y hábitat de *Salmonella*

Especies y subespecies de <i>Salmonella</i>	Hábitat
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	Humano y animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	Animales de sangre fría y el ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	Animales de sangre fría y el ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	Animales de sangre fría y el ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	Animales de sangre fría y el ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	Animales de sangre fría y el ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	Animales de sangre fría y el ambiente

(Fuente: CDC., 2011).

Los serotipos que son frecuentemente aislados en humanos y en medicina veterinaria, se denotan según el nombre del síndrome que causan (ej. *S. Typhi*), especificidad del hospedador (ej. *S. Choleraesuis*) o el origen geográfico del primer aislado (ej. *S. Dublin*) (Forshell and Wierup, 2006).

Características Generales

Salmonella es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, con un contenido de guanina-citosina (GC) de 50 a 53%. No produce endosporas. Generalmente son móviles

por flagelación peritrica, excepto los serotipos Gallinarum y Pullorum, así como variantes inmóviles de otros serotipos (Corti, 2012).

La mayoría produce gas por fermentación de carbohidratos, especialmente glucosa con excepción de los serotipos Typhi, Gallinarum y Pullorum, y algunas variantes mutantes de serotipos productores de gas, como el serotipo Dublin (Corti, 2012).

Producen la enzima catalasa y dan negativo en la prueba citocromo-oxidasa; reducen los nitratos a nitritos, toleran altas concentraciones de sales biliares y su crecimiento no se inhibe en presencia de colorantes como el azul de metileno, la eosina, la fucsina ácida, el cristal violeta y el verde brillante. Esta resistencia se emplea para el diseño de medios de cultivo selectivos, como el agar Hektoen (EH), el agar verde brillante o el agar eosina azul de metileno (EMB). Las altas concentraciones de sales biliares, así como los colorantes adicionados a estos medios inhiben la flora acompañante, permitiendo el crecimiento selectivo de *Salmonella*. La morfología de las colonias en los medios de cultivo se utiliza como carácter diferencial del género, presentando un centro negro, por producción de H₂S, de bordes lisos y convexos en agar XLD (Corti, 2012).

Son capaces de crecer en un rango de temperatura que varía de 5 a 45-47°C, siendo la temperatura óptima de 35 a 37°C. El pH óptimo de crecimiento es de 6,5-6,7; soportando un rango de 4,5-9,0. Se desarrollan bien a una actividad de agua (a_w) de 0,945 a 0,999; aunque en valores muy bajos, como los productos deshidratados, sobreviven largo tiempo. En los alimentos, pueden multiplicarse hasta valores de a_w iguales a 0,93 (Corti, 2012).

Serotipos de *Salmonella*

Las especies de *Salmonella* están clasificadas e identificadas en serotipos de acuerdo al esquema de serotipificación de Kauffmann-White, publicado por el “Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París (Grimont y Weill, 2007). Este esquema consiste en la caracterización de los antígenos somáticos (O), que determinan el serogrupo, y flagelares (H) que definen el serotipo (Tabla 2). Así, se han identificado más de 30 serogrupos y más de 2.500 serotipos diferentes (Hong *et al.*, 2008). Además se encuentra el antígeno capsular (Vi) presente en tres serotipos altamente invasivos (Kim *et al.*, 2006).

Tabla 2. Fórmula antigénica de algunos serogrupos y serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica*

Serogrupos/serotipos	Antígeno O	Antígeno H	
		Primera Fase	Segunda Fase
Grupo A (antígenos 1, 2) Paratyphi A	1, 2, 12	a	(1,5)
Grupo B (antígeno 4) Typhimurium Brandenburg Paratyphi	<u>1</u> , 4, (5), 12 4, (5), 12 <u>1</u> , 4, (5), 12	l 1, v b	1, 2 e, n, Z ₁₅ 1, 2
Grupo C (antígeno 6) Grupo C₁ Virchow Ohio Infantis Braenderup Grupo C₂ Hadar Muenchen Newport	6, 7, <u>14</u> 6, 7, <u>14</u> 6, 7, <u>14</u> 6, 7, <u>14</u> 6, 8 6, 8 6, 8, 20	r b r e, h z ₁₀ d e, h	1, 2 1, w 1, 5 e, n, Z ₁₅ e, n, x 1, 2: (z ₆₇) 1, 2: (z ₆₇)
Grupo D (antígeno 9) Panama Enteritidis Typhi	<u>1</u> , 9, 12 <u>1</u> , 9, 12 9, 12, (Vi)	1, v g, m d	1, 5 - -
Grupo E (antígeno 3) London	3, 10, (15)	1, v	1, 6
Grupo G (antígeno 13) Havana	1, 13, 23	f, g, (s)	-

Los antígenos entre paréntesis pueden estar o no presentes, y los subrayados dependen de conversión lisogénica (Grimont y Weill, 2007).

Los antígenos somáticos O son termoestables y alcohol resistentes. Forman parte del lipopolisacárido (LPS), importante componente presente en la pared celular de las bacterias Gram negativas. Posee estructuralmente tres zonas:

- Lípido A, zona más interna y con actividad tóxica (endotoxina).
- Polisacárido central o núcleo del polisacárido, con varios azúcares, muchos de ellos con estructura poco común.

- Cadena lateral O, cadena heteropolisacáridica, más o menos larga, que se extiende hacia afuera del núcleo. Su composición es altamente variable, constituyendo el antígeno O, que proporciona la especificidad (Reeves *et al.*, 1989).

Estos antígenos están clasificados en grupos y se nombran con letras arábicas mayúsculas (A-Z). Sin embargo, debido a que no fueron suficientes las letras, en la actualidad se designa cada grupo O usando el factor O característico, por ejemplo O:4 (antiguamente llamado “grupo B”) (EFSA, 2010).

Los antígenos flagelares H, son de naturaleza proteica y termolábiles. La flagelina, o proteína flagelar, importante para la locomoción de la bacteria, consiste en regiones terminales COOH y NH₂ extremadamente conservadas y una región central variable. Esta región central de la molécula porta la especificidad antigénica usada en el esquema de Kauffmann-White (Herrera-León *et al.*, 2007).

Algunos serotipos de *Salmonella* sólo producen un tipo de antígeno H, denominados monofásicos, como es el caso de Typhi. Sin embargo, la mayoría de los serotipos pueden presentar dos tipos de antígenos H, llamándose bifásicos. En estos, el antígeno flagelar puede aparecer de forma alternativa en fase 1 (H1), llamada también específica ya que es característica de cada serotipo, o en fase 2 (H2), que es menos específica y puede ser común a varios serotipos (Hong *et al.*, 2008).

En la mayoría de los aislados de *Salmonella*, dos genes codifican los antígenos flagelares. El gen *fliC* codifica los antígenos de fase 1, y el gen *fljB* codifica los antígenos flagelares de fase 2. Estos genes están expresados de forma coordinada y se expresan de a uno por vez. El gen *fliC* está localizado en un operón de biosíntesis flagelar y está presente en todas las bacterias del género *Salmonella*, y tiene un homólogo en *Escherichia coli*. El gen *fljB* está localizado en una región del genoma que es único para *Salmonella* y está presente en 5 subespecies (McQuiston *et al.*, 2004).

Cada *Salmonella* expresa alternativamente estos antígenos, mecanismo denominado “cambio de fase”, que está regulado por una recombinasa (Echeita *et al.*, 2002). Esta variación proporciona una ventaja para la bacteria, debido a que al cambiar de fase durante el proceso de infección, podrán sobrevivir a la respuesta inmune del hospedador ya que, si

éste se encuentra produciendo anticuerpos frente a la flagelina H1, las bacterias que produzcan flagelina H2 podrán escapar a la acción de los anticuerpos específicos frente a la primera (Herrera-León *et al.*, 2007).

El antígeno capsular Vi, es un polímero lineal del ácido α -1,4 (2-deoxi)-2-acetilgalacturónico, que puede estar acetilado en posición C3. Se encuentra en tres serotipos altamente invasivos: Typhi, Paratyphi C y Dublin (Raffatellu *et al.*, 2006).

Identificación de *Salmonella*

La identificación del género *Salmonella* se realiza usando pruebas bioquímicas. Para esto, se utilizan las siguientes pruebas: fermentación de la glucosa (+), lactosa (-) y sacarosa (-), formación de gas desde la glucosa (+), producción de ácido sulfhídrico (+), hidrólisis de la urea (-), descarboxilación de la lisina (+), producción de indol (-) y ausencia de la enzima β -galactosidasa. Mediante la realización de pruebas bioquímicas adicionales, es posible llegar incluso a nivel de especies y subespecies. Una vez confirmado el género, los aislados pueden ser subtipificados. El procedimiento clásico es serotipificar, seguido de la fagotipificación (para algunos serotipos de importancia epidemiológica, como por ejemplo *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*). Adicionalmente, varios procedimientos moleculares están disponibles para determinar las características genotípicas de las cepas dentro de los serotipos. Los métodos más usados son: Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE), Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST), Análisis Multilocus de Secuencias Repetitivas en Tandem (MLVA/VNTR), chip de ADN y secuenciación (EFSA, 2010).

Aunque la serotipificación es un método ampliamente utilizado, tiene deficiencias que limitan su uso tales como la necesidad de más de 250 tipos de antisueros diferentes, los antisueros comerciales son costosos, de disponibilidad limitada y calidad variable para los antígenos menos comunes (Lavalett *et al.*, 2009). Por otra parte, puede demorar entre 5 a 7 días en generar un resultado y 4 ó 5 días más si se incluye un medio enriquecido (Minicozzi *et al.*, 2013). Y, aproximadamente, el 5 a 8% de los aislamientos son parcialmente tipificados o no se pueden tipificar, debido a que existen cepas rugosas que no expresan antígenos en la superficie, encapsuladas y otras que no expresan los antígenos flagelares de las fases 1 y 2 (Lavalett *et al.*, 2009). Con la tipificación del antígeno H, ambas fases flagelares deben analizarse, lo que implica probar una fase por vez. Por lo tanto, es un

proceso que consume tiempo ya que se necesitan por lo menos tres reacciones antígeno-anticuerpo para identificar un serotipo en particular, y los serotipos raros a menudo requieren pruebas adicionales para ser correctamente tipificados (Kim *et al.*, 2006). Por lo anterior, y debido a la dificultad en la interpretación de los resultados, la aplicación de la serotipificación está limitada a los laboratorios de referencia (Lavalett *et al.*, 2009).

En respuesta a estas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado métodos moleculares basados en la técnica de PCR, permitiendo la detección directa de genes que codifican para los antígenos somáticos O y flagelares H. Las ventajas de estos métodos moleculares frente a la serotipificación es que son costo-efectivos, fáciles de estandarizar, muy sensibles, específicos, rápidos, reproducibles, independientes del uso de antisueros y no necesitan que se expresen los antígenos (Lavalett *et al.*, 2009).

La técnica de PCR es un método rápido que posee características que le permiten ser un excelente método de detección e identificación de *Salmonella spp.* y de otros patógenos. Además, las cepas carentes de antígenos somáticos o flagelares (cepas rugosas), que sólo son reconocidas como *Salmonella spp.* por el método tradicional de serotipificación, pueden identificarse mediante PCR, debido a que esta técnica detecta secuencias específicas de ADN y no se altera por las variaciones fenotípicas que se pueden evidenciar por patrones bioquímicos (Lavalett *et al.*, 2009).

Epidemiología

Desde el punto de vista epidemiológico, *Salmonella spp.* se puede clasificar en tres grupos:

- a) Las que no tienen preferencia por algún hospedero en especial, por lo que infectan tanto al humano como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de la salmonelosis.
- b) Las que infectan sólo al humano: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Paratyphi C*. Se transmiten de forma directa o indirecta de una persona a otra.
- c) Las que están adaptadas a un hospedero en especies animales: *S. Abortusovis* a los ovinos, *S. Abortusequi* a los equinos y *S. Gallinarum* a las aves (ISP, 2014).

Las serovariedades zoonóticas que se describen como no tifoidales, se encuentran distribuidas ampliamente en el reino animal, siendo las aves y sus derivados las fuentes más

comunes de infección y generalmente se presentan como brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). En la mayoría de los casos, se trata de una gastroenteritis autolimitada. Sin embargo, en algunos casos, la invasión del microorganismo puede causar septicemia (ISP, 2014).

La importancia de generar productos inocuos radica en la posibilidad de comercializarlos con la certeza de su origen y calidad sanitaria, traduciéndose en la confianza de los consumidores. Además, aumenta la probabilidad de acceder a mercados cada vez más exigentes y competitivos. La presencia de microorganismos patógenos en los alimentos y las enfermedades que causan, es un problema creciente en salud pública debido al incremento en su frecuencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, aparición de resistencia al tratamiento y el impacto socioeconómico que generan (Yáñez *et al.*, 2008).

Las infecciones por *Salmonella* no tifoidal representan un problema de salud pública internacional. A finales del año 1980 y principios de 1990, se describió un dramático incremento de salmonelosis en humanos, producida específicamente por *S. Enteritidis* (ISP, 2014). En 1995, del total de informes recopilados por los sistemas de vigilancia de los países miembros de la OMS, se encontró que el 76,1% de los aislamientos correspondían a *S. Enteritidis*, Typhimurium y Typhi. Los principales serotipos aislados a nivel mundial para el año 1995 fueron Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Infantis, Newport, Typhi, Agona, Virchow y Heidelberg. El incremento de estos serotipos ha sido el resultado de múltiples factores relacionados con el desarrollo de la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en las prácticas de manejo, almacenamiento, distribución y preparación. Estas variaciones, han tenido como consecuencia problemas de higiene, facilitando la diseminación de *Salmonella spp.* (Herikstad *et al.*, 2002).

En la Unión Europea, gracias a un estricto programa de vigilancia y control de *Salmonella*, se logró disminuir la incidencia en humanos y aves a la mitad en los últimos años. Sin embargo, en otras naciones del mundo, como por ejemplo en Estados Unidos, se registra un aumento de casos. Estas diferencias se deben al enfoque que se emplea para prevenir esta enfermedad, cuyos controles se deben llevar a cabo durante toda la cadena alimentaria (EFSA, 2011).

Debido a este peligro para la salud pública, la Unión Europea estableció el Reglamento (CE) N° 2160/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Este reglamento establece medidas para detectar y controlar esta bacteria en todas las etapas de producción, con el fin de disminuir su prevalencia. El procedimiento general es determinar la prevalencia en la población, para disminuirla y así adoptar un programa nacional de control (EFSA, 2011).

Desde abril del año 2009, se lleva a cabo el Programa Nacional de Control de *Salmonella spp.* en establecimientos comerciales de aves en Chile, el cual monitoriza y recolecta datos contemplados en el Reglamento (CE) N° 2160/2003, de los serotipos establecidos por la Unión Europea (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* para todas las aves, y *S. Hadar*, *S. Virchow* y *S. Infantis* para abuelas y reproductoras) (SAG, 2013). Este programa se lleva a cabo en todas las empresas productoras de carne de ave y es obligatoria en planteles productores de carne de pollo y pavo adscritos al Programa de Planteles Animales bajo Certificación Oficial (PABCO) y planteles que exporten aves o sus productos. Su objetivo es apoyar el proceso de certificación de la condición zoonosanitaria e inocuidad, entregando el respaldo oficial exigido por los mercados nacional e internacional (González, 2011).

En Chile, el Instituto de Salud Pública (ISP) es el Laboratorio Nacional y de Referencia para *Salmonella spp.* y le corresponde según el Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria D.S. 158/2004, confirmar los aislamientos sospechosos de *Salmonella spp.* realizados por los laboratorios clínicos públicos y privados del país. El Laboratorio de Referencia de Agentes de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA), realiza la confirmación de especie y subespecie mediante caracterización bioquímica. Una vez confirmados, se realiza la tipificación serológica, identificando antígenos somáticos y flagelares para determinar la serovariedad según el esquema de Kauffmann-White (ISP, 2014).

Debido a la importancia del género *Salmonella* en el mundo, es necesario encontrar técnicas de diagnóstico simples y rápidas que permitan su detección a partir de diferentes muestras. La serología es comúnmente usada para monitorear la enfermedad, sin embargo, la aplicación de un test serotipo-específico tendría un valor agregado en la vigilancia de la salmonelosis, ya que puede ayudar a tomar decisiones importantes respecto a la

identificación presuntiva de un patógeno y, así, colocar esfuerzos y recursos para eliminar el patógeno sospechoso de los alimentos o el plantel (Hong *et al.*, 2009). Por lo tanto, en el presente trabajo se implementarán tres métodos simple de PCR para identificar dos serotipos de relevancia en salud pública: *Salmonella* Hadar y *Salmonella* Typhimurium, ambos pertenecientes al programa nacional de control de *Salmonella* spp. en establecimientos comerciales de aves, para certificación de exportación a la Unión Europea.

OBJETIVO GENERAL

Implementar pruebas de PCR para tipificar *Salmonella enterica* serotipos Hadar y Typhimurium.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar serotipos de *S. Hadar* y *S. Typhimurium* mediante la técnica de PCR.
2. Determinar la asociación y el nivel de concordancia entre la prueba de PCR y el ensayo de serotipificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas *Salmonella* spp

Las muestras fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Bacteriología, del Complejo de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria Lo Aguirre, del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile. Se analizaron 135 aislados de *Salmonella* de diferentes especies animales, previamente identificados mediante la técnica de aglutinación y posteriormente serotipificadas por el Instituto de Salud Pública. Se incluyeron 50 cepas de *S. Typhimurium* y 50 cepas de *S. Hadar*. Como controles negativos se usaron cepas de otros serogrupos: 6 del grupo C1, 5 del grupo D, 5 del grupo E, 1 del grupo F, 5 del grupo H, 5 del grupo I y las enterobacterias *Citrobacter* spp (ATCC8090), *Escherichia coli* (ATCC25922) y *S. Enteritidis* (ATCC13076). Se utilizaron como controles positivos las cepas *S. Hadar* 1897-6A (serotipificada previamente en el ISP) y *S. Typhimurium* cepa ATCC14028.

Las cepas fueron cultivadas en agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) e incubadas a 37°C por 18- 24 horas.

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN, se transfirieron colonias aisladas a tubos con 50µL de agua desionizada. Posteriormente, fueron llevadas a un termociclador para ser calentadas a 100°C por 15 minutos, logrando así la lisis de la bacteria. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 9.900 rpm durante 3 minutos para extraer el ADN desde el sobrenadante.

PCR *Salmonella* Hadar

Para cada antígeno flagelar de fase 1 de *S. Hadar*, se extrajo 1µL del templado de ADN (100ng/ µL) y se le adicionó 24µl de la mezcla de PCR compuesta por: 1,25µL de los partidores 1 y 2 (10mM) (Tabla 3), 16,8µL de agua desionizada, 2,5µL de solución tampón para PCR (10X), 1,5µL de MgCl₂ (50Mm), 0,5µL de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) (10 mM) y 0,2µL de Taq polimerasa (5U/µL). Dando un total de 25µL de mix por tubo.

Para cada antígeno flagelar de fase 2 de *Salmonella* Hadar, se extrajo 1µL del templado de ADN (100ng/ µL) y se le adicionó 24µl de la mezcla de PCR compuesta por: 1,25µL de los

partidores 3 y 4 (10mM) (Tabla 3), 16,43μL de agua desionizada, 2,5μL de solución tampón para PCR (10X), 1,87μL de MgCl₂ (50Mm), 0,5μL de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) (10 mM) y 0,2μL de Taq polimerasa (5U/μL). Dando un total de 25μL de mix por tubo.

Tabla 3. Partidores usados en PCR para *S. Hadar*

Gen	Descripción	Secuencia	Tamaño (pb)
<i>fliC</i> :r,z ₁₀ (partidores 1 y 2)	Antígeno flagelar de fase 1	F: 5'-GCACTGGCGTTACTCAATCTC-3' R: 5'-GCATCAGCAATACCACTCGC-3'	363
<i>fljB</i> :e,n,x (partidores 3 y 4)	Antígeno flagelar de fase 2	F: 5'-TAACTGGCGATACATTGACTG-3' R: 5'-TAGCACCGAATGATACAGCC-3'	152

(Fuente: Hong *et al.*, 2008).

Los parámetros del programa en el termociclador incluyeron una etapa de calentamiento inicial a 94°C por 1 minuto, 40 ciclos de denaturación a 94°C por 1 segundo, anillamiento a 55°C por 1 segundo y una extensión final a 72°C por 1 minuto.

PCR *Salmonella Typhimurium*

Para *S. Typhimurium* se extrajo 3μL del templado de ADN y se le adicionó 9,5μL de la mezcla de PCR compuesta por: 1,25μL de los partidores 1 y 2 (10mM) (Tabla 4), 4,85μL de agua desionizada, 1,25μL de solución tampón para PCR (10X), 0,5μL de MgCl₂ (50Mm), 0,25μL de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) (10 mM) y 0,15μL de Taq polimerasa (5U/μL). Dando un total de 12,5μL de mix por tubo.

Tabla 4. Partidores usados en PCR para *S. Typhimurium*

Gen	Descripción	Secuencia	Tamaño (pb)
STM3845	Proteína hipotética de membrana interna	F: 5'-ATCGTCTCCTTTTCGTGTGTGG-3' R: 5'-ACCCATTTGCGCTCTTTTAATG-3'	700

(Fuente: McClelland *et al.*, 2001).

Los parámetros del programa en el termociclador incluyeron una etapa de calentamiento inicial a 94°C por 7 minutos, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 40 segundos, anillamiento a 57°C por 40 segundos y una extensión final a 72°C por 1 minuto.

Electroforesis en gel de agarosa

Para separar los fragmentos de ADN generados, se tomaron 5µL del producto de PCR y se les agregó 2µL de DNA Loading (6X). De esta forma, se cargó el ADN en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE teñidos con gel Green. Se puso un marcador de tamaño molecular de 100pb para llevar a cabo la electroforesis durante 30 minutos a 100 voltios. Varios serotipos de *S. enterica*, pertenecientes a los serogrupos B, C1, D, E, F, G y H, *S. Enteritidis* y las enterobacterias *Citrobacter spp* y *Escherichia coli* fueron usados en la PCR para probar la especificidad de los partidores. Además, se utilizó agua desionizada como control de los reactivos. Finalmente, los geles se visualizaron mediante un transiluminador con luz ultravioleta, donde se tomaron imágenes de los geles analizados.

Análisis de Datos

Para analizar los resultados obtenidos, se realizó una prueba de McNemar (G) para establecer la existencia de asociación entre las pruebas de PCR y serotipificación. Este estadístico es útil para contrastar el nivel de significancia de los cambios producidos por un grupo dicotomizado en relación a alguna variable, siendo aplicable a los diseños experimentales con un solo grupo que se somete a observación con dos distancias de una variable, y se basa en la aplicación de la fórmula de chi-cuadrado (X^2) en relación

únicamente a las casillas de la tabla 2x2 que representan cambios (Sierra, 1985). El contraste se realizó por la tabla de X^2 para un grado de libertad.

Finalmente, se determinó el grado de concordancia mediante el índice de Kappa de Cohen (K), utilizando la tabla de valoración señalada por López de Ullibarri y Pita (1999). Este índice es aplicable igualmente a las tablas de contingencia 2x2 que relacionan dos variables dicotómicas que van de -1 a 1.

RESULTADOS

PCR para la identificación de *S. Hadar*

Del total de cepas analizadas, las 50 cepas previamente serotipificadas como *S. Hadar* dieron positivas (100%) a las dos técnicas de PCR para identificar los antígenos flagelares H1 y H2 (figura 1). Las 35 cepas restantes usadas para evaluar una posible reacción cruzada, se encontraron resultados esperados, ya que ninguna amplificó con los partidores, lo cual indica un 100% de especificidad de la PCR.

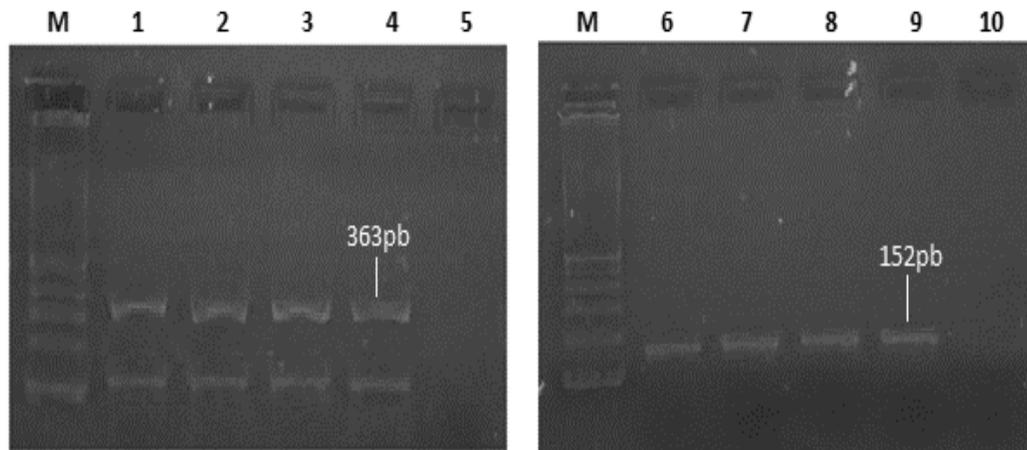


Figura 1. PCR para la identificación de los antígenos flagelares H1 (A) y H2 (B) de *S. Hadar*. Líneas M: ladder 100 pb. Líneas 1 - 3 y 6 - 8: cepas *S. Hadar*. Líneas 4 y 9: control positivo. Líneas 5 y 10: control negativo.

PCR para la identificación de *S. Typhimurium*

Del total de cepas analizadas, 46 cepas previamente serotipificadas como *S. Typhimurium* dieron positivas (92%) a la técnica de PCR para identificar el gen STM3845 (figura 2). Las 35 cepas restantes usadas como control dieron negativas a esta técnica de PCR.

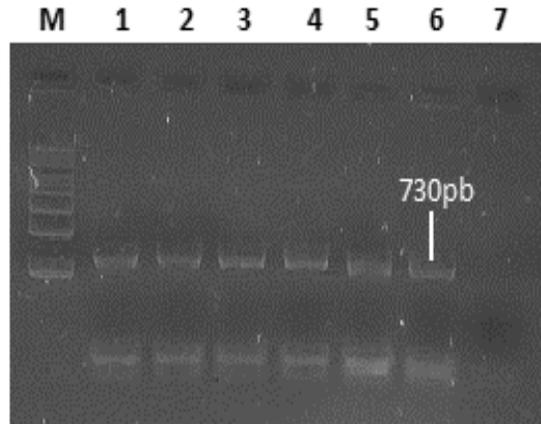


Figura 2. PCR para la identificación del gen STM3845 de *S. Typhimurium*. Línea M: ladder 1k pb. Líneas 1 - 5: cepas *S. Typhimurium*. Línea 6: control positivo. Línea 7: control negativo.

Diferencias estadísticas de la prueba de PCR y el ensayo de serotipificación

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de Mc Nemar para determinar la existencia de diferencias estadísticas entre la serotipificación tradicional y la técnica de PCR.

El resultado de la prueba de Mc Nemar para *S. Hadar* (1) fue menor al valor tabular de X^2 con 1 grado de libertad y un error de 5% (3,84), por lo que se concluye que no existen diferencias significativas entre ambas técnicas evaluadas.

En el caso de *S. Typhimurium*, el resultado de la prueba de Mc Nemar (2,25) también fue menor al valor tabular de X^2 para 1 grado de libertad y un error de 5% (3,84), por lo que tampoco existen diferencias significativas.

Nivel de concordancia de la prueba de PCR y el ensayo de serotipificación

Se utilizó el índice Kappa, con un nivel de confianza de 95%, para establecer el nivel de concordancia entre ambas técnicas.

Se encontró concordancia entre la técnica de PCR y la serotipificación tradicional (tabla 5) en los 50 aislados evaluados para *S. Hadar* ($k=1$). En el caso de *S. Typhimurium* también hubo una muy buena concordancia ($k=0.9$) en 46 de los 50 aislados.

Tabla 5. Grado de concordancia entre la técnica de serotipificación y la PCR.

Serotipos	Concordancia Observada	Concordancia Esperada	Índice kappa*
<i>S. Hadar</i>	1	0.52	1
<i>S. Typhimurium</i>	0.95	0.51	0.90

*Grado de acuerdo: $k < 0$ (sin acuerdo); $k > 0 - 0.2$ (insignificante); $k > 0.2 - 0.4$ (bajo); $k > 0.4 - 0.6$ (moderado); $k > 0.6 - 0.8$ (bueno); $k > 0.8 - 1$ (muy bueno) (Fuente: Landis y Koch, 1977).

DISCUSIÓN

El método de serotipificación tradicional para *Salmonella* ha permitido identificar más de 2.500 serotipos, basados en las características antigénicas de la superficie del lipopolisacárido (antígeno O), la proteína flagelar de fase 1 (H1) y la proteína flagelar de fase 2 (H2). Sin embargo, la serotipificación mediante el esquema Kauffmann-White tarda mucho tiempo, requiere de personal bien entrenado, usa grandes cantidades de sueros (Herrera-León *et al.*, 2004) y son menos sensibles comparadas con la técnica de PCR (Oliveira *et al.*, 2002).

La serotipificación se considera el método de referencia para la identificación de serotipos de *Salmonella*. Sin embargo, la PCR podría aplicarse como método rutinario para laboratorios de tercer nivel y de salud pública que requieran la identificación de esta bacteria en un menor tiempo y a menor costo (Lavalett *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado la alta capacidad que tiene la PCR para detectar genes de interés, transformándose en una poderosa herramienta para la microbiología clínica. Echeita *et al.* (2002) mostraron que, mediante una PCR múltiple, fue posible identificar los antígenos flagelares de segunda fase más comúnmente aislados en España. Asimismo, Herrera-León *et al.* (2004) también desarrollaron una PCR múltiple para identificar los antígenos flagelares de fase 1, obteniendo una correlación del 100% entre la PCR y la serotipificación tradicional.

Con el fin de acelerar el proceso de identificación, en este trabajo se implementaron métodos de diagnóstico serotipo-específico, mediante la técnica de PCR, para *Salmonella* Hadar y *Salmonella* Typhimurium, serotipos involucrados en el Programa de control de *Salmonella spp.* en establecimientos comerciales de aves para exportación a la Unión Europea.

La PCR implementada en este estudio, para el caso de *S. Hadar*, evaluó cuatro partidores, previamente publicados por Hong *et al.* (2008) que codifican para los genes *fliC* y *fljB*. Los resultados obtenidos demuestran que esta técnica es altamente específica, ya que se logró identificar correctamente las 50 cepas de *S. Hadar*, sin reacciones cruzadas con el resto de las cepas analizadas. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Echeita *et al.*

(2002), Herrera-León *et al.* (2004) e Imre *et al.* (2005), confirmando la utilidad de los genes *fliC* y *fljB* como marcadores serotipo-específicos.

Según lo planteado por McQuiston *et al.* (2004) las secuencias de los genes *fliC* y *fljB* para *Salmonella* están altamente conservados en las regiones terminales 5' y 3', mientras que las secuencias de la región central son variables. Sin embargo, este descubrimiento sólo se aplica para los genes que codifican los antígenos H que no son parte del complejo flagelar, las secuencias de los genes que codifican la proteína del complejo son muy similares, lo que excluye el uso de estas secuencias para serotipificar (Muñoz *et al.*, 2010)

Los resultados obtenidos mostraron una alta concordancia entre el método molecular y el tradicional (100%). Estos resultados indican altos valores de sensibilidad y especificidad para la prueba molecular implementada.

Para *S. Typhimurium*, la PCR implementada usó primers para amplificar un segmento del gen STM3845, que codifica una proteína hipotética de membrana sin función conocida. De las 50 cepas analizadas, sólo 46 dieron positivas a la técnica de PCR. Los cuatro falsos negativos podrían sugerir que la técnica genética implementada no es 100% sensible. Sin embargo, al calcular el grado de concordancia entre la serotipificación tradicional y la PCR, hubo un alto acuerdo entre ambas técnicas (90%).

El hecho de que cuatro cepas serotipificadas como *S. Typhimurium* dieran negativas a la PCR puede ser consecuencia de variaciones en la secuencia del gen blanco o bien por su ausencia.

S. Typhimurium es un serotipo que presenta una amplia gama de hospederos, sin embargo, algunas variantes se han adaptado a un hospedero en particular. La adaptación a un hospedero asegura la circulación de la bacteria en una población animal, y su proceso puede involucrar la adquisición de determinantes de virulencia y/o la pérdida de las funciones de ciertos genes (Rabsch *et al.*, 2002).

Por ejemplo, en el estudio realizado por Pang *et al.* (2013) se evidenció que la inserción de ciertos genes en el genoma de *S. Typhimurium*, le proporcionó una ventaja selectiva a la bacteria al hacerla más resistente a los antibióticos.

El genoma de bacterias relacionadas puede diferir de tres maneras: (i) contenido del genoma, donde una especie bacteriana o cepa alberga genes ausentes; (ii) sustitución de nucleótidos dentro de secuencias conservadas del ADN, que puede resultar en cambios de los aminoácidos en proteínas ortólogas, formando pseudogenes y promoviendo un patrón de expresión distinto de genes presentes en los dos organismos (iii) cambio en la disposición de los genes, causado por inversiones y translocaciones. Estas diferencias se han visto no sólo a través de especies bacterianas, sino también entre cepas pertenecientes a la misma especie (Achtman, 2008).

Estudios previos han examinado la acumulación de sustituciones en cepas de bacterias de laboratorio, en el que los microorganismos son mantenidos en condiciones de continuo crecimiento (por ejemplo cultivo seriado) y las mutaciones le confieren una ventaja selectiva (Herring *et al.*, 2006). En estas situaciones, no sólo se acumulan mutaciones y reordenamientos genéticos, a veces también se pierden características que no están bajo selección. Por ejemplo, es común que las bacterias cultivadas sean menos virulentas, pierdan flagelos, cambien la morfología de las colonias y eliminen elementos extracromosomales (Jarvik *et al.*, 2010).

Variaciones genéticas se han observado en estudios de cepas de *S. Typhimurium*. Por ejemplo, Jarvik *et al.* (2010) realizaron un estudio para identificar los cambios que diferencian las cepas de este serotipo y evaluaron la naturaleza de la variación que surge durante el almacenamiento en laboratorio. En este estudio, se analizaron dos cepas de *S. Typhimurium*: ATCC14028 y LT2, que tienen en común un plásmido de virulencia que promueve la replicación intracelular y la enfermedad sistémica en el hospedero, pero difieren en el contenido de los profagos. Los resultados obtenidos demuestran que, a pesar de que estas dos cepas de *S. Typhimurium* están altamente emparentadas, poseen diferencias en la secuencia del ADN debido a la existencia de pseudogenes. Estos pseudogenes son comunes y son el resultado de deleciones o inserciones nucleotídicas que implican un cambio en el marco de lectura o por polimorfismo de un nucleótido simple, resultando en un codón de término.

Las mutaciones presentan variaciones en las secuencias de genes analizados, resultando en una pérdida de reactividad de los partidores usados. Por lo tanto, es posible que los

partidores usados pudieran dejar de dar resultados positivos si las mutaciones afectan algún sitio de unión de los cebadores. Sin embargo, debido a que la PCR tuvo una alta concordancia y no se registró ningún resultado falso positivo, se puede utilizar como una técnica complementaria o alternativa a la serotipificación de *S. Typhimurium*, especialmente en los casos donde se observe amplificación.

Los resultados obtenidos muestran que la técnica de PCR, para la detección de estos serotipos, es una buena alternativa para mejorar las limitaciones que presenta la serotipificación tradicional, ya que es un método sensible, específico, reproducible y costo-efectivo, permitiendo aplicar esta técnica molecular como complemento a los métodos tradicionales (Lavalett *et al.*, 2009). Sin embargo, esto no significa que la serotipificación tradicional se deba descartar. Ambos métodos son complementarios, y los métodos moleculares simplemente mejoran las herramientas disponibles para tipificar de forma exitosa las cepas que causan problemas para la salud.

Por lo tanto, las técnicas de PCR implementadas serían una excelente herramienta para detectar y tipificar *Salmonella*, con el fin de rastrear el origen de la contaminación. Es por esto que se ha convertido en una importante herramienta para detectar la presencia de patógenos microbianos en alimentos, mediante la identificación de genes diana o secuencias de nucleótidos únicos de un patógeno específico, de un serotipo o una cepa. Por lo tanto, la PCR puede ayudar a tomar decisiones importantes respecto a la identificación presuntiva de patógenos, poner esfuerzos y recursos para el aislamiento del patógeno sospechoso.

En el futuro, sería importante desarrollar una PCR múltiple para identificar los cinco serotipos incluidos en el Programa de Vigilancia Nacional, y así tener un método diagnóstico más eficiente y rápido.

CONCLUSIONES

1. Se logró identificar los serotipos de *S. Hadar* y *S. Typhimurium* mediante la técnica de PCR, demostrando su especificidad y rapidez para dar un resultado positivo.
2. No existen diferencias estadísticas entre el ensayo de serotipificación tradicional y las técnicas de PCR implementadas para ambos serotipos analizados.
3. Existe un alto grado de concordancia entre la prueba de serotipificación tradicional de *S. Hadar* y *S. Typhimurium* y las técnicas de PCR implementadas para la detección de ambos serotipos.

BIBLIOGRAFÍA

ACHTMAN, M. 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 53-70.

CDC. 2011. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Surveillance Overview. [en línea].

<http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf>

[consulta: 28-02-2015].

CORTI, H. 2012. Prevención y Control de *Salmonella* en la industria avícola de carne. [en línea]. <http://www.feednews.cl/neo_2012/pdf/humberto_corti_feednews_2012.pdf>

[consulta: 29-04-2014].

ECHEITA, MA.; HERREA, S.; GARAIZAR, J.; USERA, MA. 2002. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. *Res. in Microbiol.* 153: 107-113.

EFSA. 2010. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal.* 11(12): 3460.

EFSA. 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal.* 9(3): 2090.

FORSHELL, LP.; WIERUP, M. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 25 (2): 541-554.

GONZÁLEZ, A. 2011. III Encuentro del Programa de Reducción de Patógenos. Programa de Control de *Salmonella spp.* en establecimientos comerciales de aves. [en línea].

<[http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%20la%20Oficina/Curso BPPPA/Literatura/Chile%20Programa%20de%20Reduccion%20de%20Patogenos,%202011.pdf](http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%20la%20Oficina/Curso%20BPPPA/Literatura/Chile%20Programa%20de%20Reduccion%20de%20Patogenos,%202011.pdf)> [consulta: 29-04-2014].

GRIMONT, PAD.; WEILL, FX. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, Pasteur Institute. 1-166.

HERISKTAD, H.; MOTARJEMI, R.; TAUXE, RV. 2002. *Salmonella* surveillance: a global Survey of public health serotyping. *Epidemiol Infectol.* 129: 1-8.

HERRERA-LEÓN, S.; MCQUISTON, JR.; USERA, MA.; FIELDS, PI.; GARAIZAR, J.; ECHEITA, MA. 2004. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella spp.* *J. Clin. Microbiol.* 42 (6): 2581-2586.

HERRERA-LEÓN, S.; RAMIRO, R.; ARROYO, M.; DÍEZ, R.; USERA, MA.; ECHEITA, MA. 2007. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res. in Microbiol.* 158 (2007): 122-127.

HERRING, CD.; RAGHUNATHAN, A.; HONISCH, C.; PATEL, T.; APPLEBEE, MK.; JOYCE, AR.; ALBERT, TJ.; BLATTNER, FR.; VAN DEN BOOM, D.; CANTOR, CR.; PALSSON, B. 2006. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. *Nat. Genet.* 38: 1406-1412.

HONG, Y.; LIU, T.; LEE, MD.; HOFACRE, CL.; MAIER, M., WHITE, DG.; AYERS, S.; WANG, L. BERGHAUS, R.; MAURER, J.J. 2008. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiol.* 8: 178.

HONG, Y.; LIU, T.; LEE, MD.; HOFACRE, CL.; MAIER, M.; WHITE, DG.; AYERS, S.; WANG, L.; BERGHAUS, R.; MAURER, J. 2009. A Rapid Screen of Broth Enrichments for *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg, and Typhimurium by Using an Allelotyping Multiplex PCR That Targets O- and H-Antigen Alleles. *J. Food Prot.* 72 (10): 2198-2201.

IMRE, A.; OLASZ, F.; NAGY, B. 2005. Development of a PCR system for the characterization of *Salmonella* flagellin genes. *Acta Vet. Hung.* 53 (2): 163-172.

ISP. 2014. Vigilancia de laboratorio *Salmonella spp.* 2009-2014. *Boletín ISP.* 4 (10): 1-18.

- JARVIK, T.; SMILLIE, C.; GROISMAN, EA.; OCHMAN, H.** 2010. Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *J. Bacterio.* 192 (2): 560-567.
- KIM, S.; FYE, JG.; HU, J.; FEDORKA-CRAY, PJ.; GAUTOM, R.; BOYLE, DS.** 2006. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (10): 3608-3619.
- KONEMAN, EW.; ALLEN, SD.; JANDA, WM.; SCHRECKENBERGER, PC.; WINN, W.** 2008. Diagnóstico Microbiológico. 6ª Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Capítulo 6, página 241-242.
- LANDIS, JR.; KOCH, GG.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Bio.* 33: 159 – 174.
- LAVALETT, L.; SÁNCHEZ, MM.; MUÑOZ, N.; MORENO, J.; CARDONA-CASTRO, N.** 2009. Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella enterica*. *Biomédica.* 29: 244-252.
- LÓPEZ DE ULLIBARRI, I.; PITA, S.** 1999. Medidas de concordancia: El índice Kappa. In: Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo, España. pp. 169-171.
- MCCLELLAND, M.; SANDERSON, KE.; SPIETH, J.; CLIFTON, SW.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, RK.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 413 (6858): 852-856.
- MCQUISTON, J.; PARRENAS, R.; ORTIZ-RIVERA, M.; GHEESLING, L.; BRENNER, F.; FIELDS, P.** 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1923-1932

- MINICOZZI, J.; SANCHEZ, S.; LEE, M.; HOLT, P.; HOFACRE, C.; MAURER, J.** 2013. Development of Recombinant Flagellar Antigens for Serological Detection of *Salmonella enterica* Serotypes Enteritidis, Hadar, Heidelberg, and Typhimurium in Poultry. *Agriculture*. 3 (2): 381-397.
- MUÑOZ, N.; DÍAZ-OSORIO, M.; MORENO, J.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ. M.; CARDONA-CASTRO, N.** 2010. Development and evaluation of multiplex real-time polymerase chain reaction procedure to clinically type prevalent *Salmonella enterica* serovars. *J. Mol. Diagn.* 12 (2): 220-225.
- OLIVEIRA, SD.; SANTOS,LRD.; SCHUCH, MT.; SILVA, ABC.; SALLE, TP.; CANAL, CW.** 2002. Detection and identification of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87: 25-35.
- PANG, S.; OCTAVIA, S.; FENG, L.; LIU, B.; REEVES, P.; LAN, R.; WANG, L.** 2013. Genomic diversity and adaptation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from analysis of six genomes of different phage types. *BMC Genomics*. 14 (1): 718.
- RABSCH, W.; ANDREWS, HL.; KINGSLEY, RA.; PRAGER, R.; TSCHAPE, H.; ADAMS, LG.; BAUMLER AJ.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* 70: 2249-2255.
- RAFFATELLU, M.; CHESSA, D.; WILSON, RP.; TUKEL, C.; AKCELIK, M.; BAÜMBER, AJ.** 2006. Capsule-mediated immune evasion: A new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect. Immun.* 74: 19-27.
- REEVES, MW.; EVINS, GM.; HEIBA, AA.; PLIKAYTIS, BD.; FARMER, JJ.** 1989. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. *J. Clin. Microbiol.* 27: 313-320.
- SAG.** 2013. Informe sanidad animal Chile año 2013. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/situacion_sanitaria_animal_2013_0.pdf> [consulta: 28-02-2015].
- SIERRA, R.** 1985. Técnicas de investigación social, teoría y ejercicios. 4^a ed. Parainfo. Madrid, España. pp. 602-603.

YÁNEZ, E.; MÁTTAR, S. DURANGO, A. 2008. Determinación de *Salmonella spp.* por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Infect. 12 (4): 246-253.