

RESULTADOS PRELIMINARES DE CAMPO DEL TRABAJO DE INVESTIGACION EN SALMONELOSIS AVIAR EN EL CICLO COMPLETO DE POLLOS DE ENGORDE

Javier Eduardo Gómez Meza¹, Carlos Alberto Venegas Cortés¹, Ernesto Andrés Dalmau Barros¹, César Augusto Díaz Rojas¹ 1.Universidad de la Salle; Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programas de Medicina Veterinaria y Zootecnia

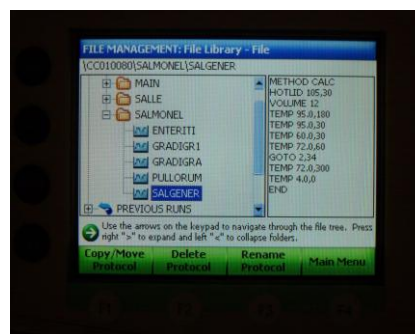
INTRODUCCION

La avicultura en Colombia es uno de los sectores más dinámicos y de mayor importancia a nivel pecuario, con un crecimiento promedio de 8,3% en los últimos años (6,4 para huevo y 10,8 para pollo de engorde), al igual que representa un gran porcentaje en el inventario de la actividad pecuaria, con cifras para el año 2009 la colocaban en el primer lugar con un 49% con respecto a las demás especies pecuarias. Por otro lado, para el mismo año representó el 14,82% de la producción pecuaria del país, ubicándose en segundo lugar, solo por debajo de la producción ganadera (Dane, 2009). Sin embargo, la avicultura se ve afectada por un sin número de enfermedades tanto infecciosas como metabólicas que no solo afectan el bienestar de las aves, sino que impactan de forma directa en la producción, ocasionando pérdidas económicas incalculables. (Fenavi, 2012).

En materia de sanidad aviar, existen tres enfermedades de control oficial: a)Influenza Aviar b)Newcastle y c)Salmonelosis aviar, debido a sus implicaciones como enfermedad zoonótica, (Conpes, 2007). Estudios realizados en Latinoamérica durante el año 2000, permitieron evaluar y tipificar los serotipos de *Salmonella* en centros de referencia de cada país, de un total de 9.402 cepas aisladas, predominó la *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium*, de explotaciones avícolas (FAO/OMS, 2002). Diversos laboratorios que analizaron los casos que se presentaron en Colombia durante el año 2006, diagnosticaron la presencia de *Salmonella*, en especial del grupo D; la mayoría de aislamientos se hicieron de muestras de hígado, vesícula biliar y folículos ováricos (Pulido, 2008).

Las pruebas bacteriológicas y moleculares (PCR) realizadas en un laboratorio fuera de Colombia identificaron cepas como *Salmonella* enterica, serovariedad *Gallinarum*, biovariedad *Gallinarum* (Sánchez, 2003). Las salmonellas pueden aislarse utilizando varias técnicas, una de las cuales es un pre-enriquecimiento para recuperar salmonellas, medios de enriquecimiento que contienen sustancias inhibitorias para evitar microorganismos competidores, y medios sólidos selectivos en placa para diferenciar las salmonellas de otras enterobacterias. Para obtener una confirmación definitiva de la cepa aislada, se pueden aplicar varias pruebas bioquímicas y serológicas a los cultivos puros. Las salmonellas poseen antígenos llamados somáticos (O), flagelares (H) y de virulencia (Vi), que pueden identificarse por sueros específicos de tipo, y después puede determinarse el serotipo por referencia a la fórmula antigénica del esquema de Kauffman-White. (OIE, 2004).

Cada día las diferentes técnicas moleculares están avanzando hacia un diagnóstico más sensible y específico para encontrar como los microorganismos pueden ser identificados y caracterizados. Los métodos de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y no todas las cepas aisladas pueden ser identificadas. Contrariamente, la técnica de PCR es una metodología rápida, específica y muy sensible para detectar, identificar y caracterizar a las bacterias de dicho Género (Ferraz, 2005). Las técnicas por PCR pueden reconocer diferentes secuencias de nucleótidos de las comunidades de Salmonellas presentes en reproductoras y pollos de engorde (Cao-Yan *et al*, 2008). Estas secuencias de nucleótidos “Primer” fueron trabajados inicialmente por Moganedi en el 2005, Por secuencias distribuidas por cada primer, así la secuencia era específica para el género *Salmonella*.



En consecuencia cuando la salmonelosis se determinó como una enfermedad zoonótica de gran importancia estas técnicas mejoraron, utilizando el PCR-TiRe con doble extracción de ADN y utilizando SYBR-green, como una técnica novedosa donde se puede utilizar en alimentos contaminados ayudando a la salud pública, debido a que son técnicas diagnósticas oportunas y rápidas (Medici, *et al*, 2003; Malory, *et al*, 2004). Así se inicio la segunda generación de técnicas en PCR en tiempo real, que es una metodología potencial para la amplificación y detección como uno de los pasos para el diagnóstico de salmonelosis en alimentos para uso humano y animal. (Kreader, 1996). Estas técnicas han sido bien descritas (Gutzman, 1976, Croci *et al*, 2000, Jensen, 2002, Inglis, 2006. Fedorka, 2006). En Colombia estudios de incidencia y prevalencia están enfocados en algunas zonas del país (Sánchez, 2005); sin embargo estos conocimientos están enfocados a pocas pruebas y localizados en algunas zonas (Alvares, 2005).

OBJETIVOS

Aislar e identificar mediante técnicas bioquímicas las diferentes especies de Salmonella pullorum, S. gallinarum, S. enteritidis y S. typhimurium en algunas granjas de Cundinamarca en el ciclo completo de producción de pollo de engorde.

Identificar a partir del PCR convencional las diferentes cepas de Salmonella previamente identificadas de S pullorum, S. gallinarum, S. enteritidis y S. typhimurium en el ciclo completo de producción de pollo de engorde en Cundinamarca.

METODOLOGIA

El proyecto fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Universidad De La Salle. Para el desarrollo del siguiente proyecto de investigación se conto con la participación de 2 empresas del sector productivo.

Estas empresas poseen los procesos de producción de pollos de engorde debidamente identificados, (Reproductoras pesadas, planta de incubación, pollos de engorde y plantas de sacrificio). Además, se acompañó con la implementación de actividades de bioseguridad en cada una de ellas supervisadas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), ya que estas empresas hacen parte del programa de control de enfermedades infectocontagiosas implantadas por el estado (Newcastle, Influenza aviar).

Las empresas cuentan con diferentes granjas ubicadas en diversos municipios de Cundinamarca que hicieron parte del proceso de identificación y caracterización de las diferentes cepas de Salmonella. La población avícola de la región de Cundinamarca esta cerca de los 20-25 millones de pollos de engorde, cerca de 5 millones de reproductoras, 10 plantas de incubación y 20 plantas de sacrificio (DANE, 2004). Con base a estos datos, se estableció el número de animales que podrían ser muestreados en un manejo de trazabilidad reportada por Dito en 1992.

Toma de muestras y envió a laboratorio

El número de muestras que fueron adquiridas en los diferentes procesos fue de 4.500, repartidas en reproductoras, planta de incubación, pollos de engorde y planta de sacrificio. Para la toma de muestra se emplearon Hisopos cloacales estériles; debidamente marcados y etiquetados; el muestreo para las reproductoras fue de de 2 empresas, 5 lotes de reproductoras por empresa, 30 hisopados (por lotes por grupos de 30 animales), por mes, durante 6 meses, para un total de 1800 Muestras ($2 \times 5 \times 30 \times 6 = 1800$ muestras).

Posteriormente de estos lotes de reproductoras se tomaron muestras de huevos incubables en la respectiva planta de incubación. El muestreo para la planta de incubación fue de: 5 lotes de reproductoras por empresa (2), (cada muestra es de 30 Huevos picados no nacidos, de 21 días de incubación). Por mes, durante 6 meses, para un total de 600 Muestras ($5 \times 2 \times 6 = 600$ muestras).

Para el muestreo en los pollos de engorde se realizó por medio de Hisopos cloacales estériles por lote, provenientes de los huevos de las mismas reproductoras, por empresa, por mes, por 6 meses. 5 lotes de reproductoras por empresa, 30 hisopados (cada hisopado es por lotes de grupos de 30 animales), por mes, durante 6 meses, para un total de 1800 Muestras. ($2 \times 5 \times 30 \times 6 = 1800$ muestras).

Para la toma de muestras de la planta de sacrificio, se estableció contacto con el frigorífico de aves que pertenecen a las mismas empresas, para hacer el respectivo muestreo por alguno de los investigadores. Se tomaron por medio de Hisopos cloacales, 5 lotes de reproductoras, por empresa, durante 3 meses. ($2 \times 5 \times 3 = 300$ muestras).

Estas muestras se llevaron hasta el laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de La Salle, sede La Floresta. Usando los recipientes respectivos para tal fin de acuerdo al muestreo realizado y según las recomendaciones de los manuales por parte del ICA, Hisopos cloacales en tubos de ensayo con solución salina estéril debidamente refrigerados e identificados (fecha, hora, temperatura, lote) para reproductoras y pollos de engorde, o frascos schot de 100 ml para la toma de muestra huevos en la planta de incubación. El tiempo transcurrido entre toma de muestra y análisis fue de máximo de 24 horas.

Aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas

Para el aislamiento de la Salmonella cada muestra obtenida de reproductora, huevo e hisopo cloacal, fue sometido a un pre-enriquecimiento utilizando agua peptonada estéril, con el objeto de rescatar y vivificar las bacterias; estas muestras fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Luego se realizó un subcultivo en un medio de enriquecimiento de caldo tetrionato, con el objeto de inhibir el crecimiento de flora competitiva y aumentar su concentración. Posteriormente se llevó a incubación a 43°C por 24 horas al baño maría. Se realizó cultivos en medios selectivos XLT4, los cuáles inhiben el crecimiento de otras bacterias y permiten el crecimiento de la Salmonella. Se llevó a incubación a 37°C por 24 - 48 horas. Luego se realizó coloración de Gram.

para determinar las características de las bacterias y se procedió a efectuar las correspondientes pruebas Bioquímicas. (Técnicas reportadas por ICA).

Caracterización por técnicas moleculares

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y su extracción de ADN se empleo el High Pure PCR Template Preparation Kit. ROCHE Cat. No. 11796828001 (100rx). Este kit está diseñado para purificar ácidos nucleicos a partir de distintos tipos de muestra, incluyendo sangre, cultivos celulares y tejidos. Se uso siguiendo las instrucciones del fabricante. Del tubo eppendorf conservado en refrigeración se tomo las cepas de Salmonella y seguidamente se suspendio en 200µl de solución de ligaje suplementada con 40µl de proteinasa K. Se incubo durante 10min a 70°C. Se adiciono 100µl de isopropanol, se mezclo bien y se transfirió a una columna de filtración y se ensambló en un tubo de colección. Se transfirió la columna de filtración a un nuevo tubo de colección y se adiciona 500µl de buffer de lavado a la columna de filtración. Se centrifuga por 1min a 8000g. Se descarta el sobrenadante y el tubo de colección. Se transfiere la columna de filtración a un nuevo tubo de colección y se adiciona 500µl de buffer de lavado a la columna de filtración. Se centrifuga por 1min a 8000g. Se descarta la columna de filtración. El ADN obtenido está listo para ser usado. (Hong, et al, 2003).

Amplificación De ADN (PCR)

Para la amplificación de ADN se empleo el TAQXpedite PCR System (FAST end-point) EPICENTRE Cat. No. TXP78200. EL KIT está diseñado para asegurar la reproducibilidad de las reacciones de PCR. Se uso siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfirió 23µl de esta mezcla a tubos de 0.2ml y se adiciono 2 µl de ADN de la muestra correspondiente. Se adiciono 18 ul de chill-out (BIORAD) a cada tubo. Se llevo al termociclador y se corrió bajo las siguientes condiciones: 95°C por 2min por 34 veces. La extensión final de 72°C por 5min a 4°C. (Cao, 2008).

Visualización

Se pesó 1,2gr de agarosa y se preparó un gel al 1.5% en buffer TBE 0.5X. Se adicionó 1ul de bromuro de etidio, se mezcló y se sirvió en bandeja formadora de geles con los peines correspondientes. Se dejó gelificar por al menos durante 20 min. Se sirvió el marcador de tamaño molecular y cada una de las muestras en el pozo correspondiente. Se corrió la electroforesis en gel horizontal a 125v por 30min. Se transfirió el gel a un transiluminador de luz ultravioleta y se documentó fotográficamente el resultado. (Castagna, 2005)

RESULTADOS

Fase 1: Entre julio del 2010 y noviembre del 2011, Se obtuvieron 3840 muestras de hisopo cloacal para aislamiento de Salmonella en reproductoras (480), en planta de incubación (480), en pollos comerciales (480) y en planta de sacrificio (480), de una empresa de Cundinamarca, realizando seguimiento al ciclo productivo. Los hisopos se refrigeraron y pasaron a medio enriquecido de agua peptonada estéril, se cultivaron en medios no selectivos y selectivos para salmonella, se efectuaron las pruebas bioquímicas con el Kit BBL-Cristal y se realizó la lectura e interpretación de cada prueba. Se aislaron 160 cepas las cuales se mantienen en criopreservación. Estos aislamientos fueron 38 de reproductoras, 37 de incubación, 43 de pollos de engorde y 42 de planta de sacrificio. Los aislamientos se tipificaron por pruebas bioquímicas como 113 de *S. typhimurium*, 44 como *S. enteritidis* y 4 como *S. pullorum*. Entre los resultados parciales se tiene, además de los aislamientos de salmonellas en el ciclo productivo del pollo de engorde, un manual de bioseguridad y buenas prácticas para el control y prevención de salmonella en explotaciones avícolas. Así como la realización de 12 procedimientos operacionales estandarizados (POE) basados en la legislación nacional e internacional, vigentes.

Tabla 1. Distribución de muestras de aislamientos de *Salmonella spp.*, para PCR convencional. Primer grupo.

FASE	ETAPA DEL CICLO	NÚMERO DE MUESTRAS
1	Reproductoras	15
1	Incubación	16
1	Pollo de Engorde	20
1	Sacrificio	18
2	Reproductoras	23
2	Incubación	21
TOTAL		113

Con el fin de contribuir al diagnóstico de la salmonelosis en aves, a partir de muestras de hisopos cloacales o de lavados de carcasas de pollos en plantas de sacrificio, se normalizaron cuatro técnicas de PCR para la detección de *Salmonella spp.*, mediante la detección del gen *invA*, *Salmonella enteritidis*, mediante la detección del gen *fliC*, *Salmonella typhimurium* mediante la detección del gen *mdh*, y *Salmonella gallinarum/pullorum* mediante la detección del gen *rfbS*, para ello se utilizaron cepas de referencia de *Salmonella enterica var typhimurium* CRM-124208, *Salmonella enterica var enteritidis* ATCC-4931 y *Salmonella entérica var pullorum* ATCC-10398.

La extracción de ADN se normalizó a partir de muestras de hisopos cloacales transportados en agua peptonada y preincubados a 37°C por 24 horas; de muestras en medio de enriquecimiento tetracionato y de caldo RVS. Para la extracción se utilizó el Kit High pure Viral Nucleic Acid ROCHE®, con algunas modificaciones, la visualización de los productos se realizó en agarosa 1% en TBE 1X con Syber-safe.

Tabla 2. Relación de la extracción de DNA a partir de las muestras aisladas de *Salmonella spp.*

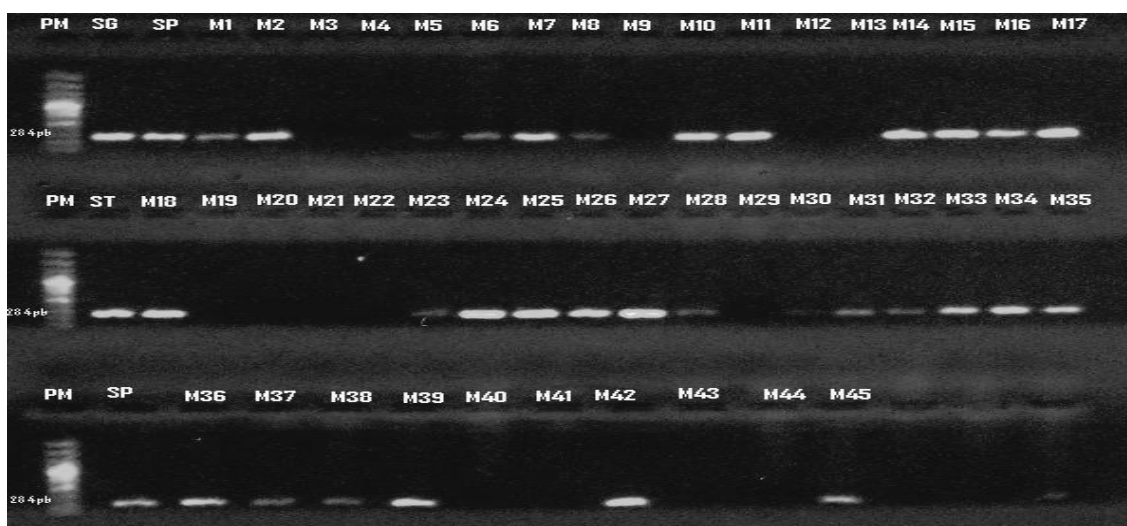
Fecha 2011	Reproductoras	Incubación	Pollo de Engorde	Sacrificio
Septiembre 26	15	9	-	-
Septiembre 27	-	7	17	-
Septiembre 27	3	-	3	18
Octubre 03	19	5	-	-

Octubre 03	1	16	-	-
TOTAL	38	37	20	18

Se obtuvo 160 aislamientos de *Salmonella spp* de dos granjas avícolas de Cundinamarca de ciclo completo (Reproductoras, incubación, pollos de engorde y planta de sacrificio) de los cuales se detectó genoma para *Salmonella* genérica en 147 de 158 (93.03%) las cuales fueron tipificadas como *Salmonella enterica var typhimurium* 100 de 158 (63.29%); *Salmonella enterica var enteritidis* 43 de 158 (27.21%) y únicamente 4 de 158 (2.53%) como *Salmonella enterica var gallinarum / pullorum*. Estos aislamientos concordaron con la clasificación por pruebas bioquímicas realizada. La rapidez y confiabilidad del diagnóstico realizado por PCR a partir de muestras

Una vez realizado cada procedimiento para PCR convencional, se procedió a realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE. Se emplearon 5 µl de la muestra una vez realizada la PCR más 1 µl de EZ-vision®. En el caso de los controles positivos y negativos, se procedió de la misma forma y para el marcador de peso molecular se tomaron 2 µl y se le adicionó 1 µl de EZ-vision®, realizando la preparación en placas Terasaki de 60 pozuelos.

Gráfica 1. Resultados a *Salmonella spp* por PCR detectando el gen invA



PM: Peso molecular. SP *Salmonella pullorum* SG *Salmonella gallinarum* ST *Salmonella typhimurium*
M1 a M45: Muestras de DNA extraído de muestras positivas por cultivo a *Salmonella spp*

Referencias

Álvarez. D. C. M.; Pulido. M.; 2005 Diagnostico microbiológico de casos de salmonelosis aviar en granjas de pollo de engorde en Cundinamarca. Reporte de casos. Editorial Universidad Nacional, Bogotá, Colombia. Pp. 80.

Cao, S., Wang, M., Cheng, A., Qi, X., Yang. 2008. Comparative analysis of intestinal microbial community diversity between healthy and orally infected duckling with salmonella enteritidis by ERIC-PCR. World Gastroe. February 21; 14(7):1120-1125

Cervantes, H. 2002. Control de Salmonella en Reproductora de Engorde y Su Progenie. Director de Sanidad Aviar y Control de Calidad, Peterson Farms, Arkansas, U.S.A. Ediciones, Decatur. p. 35-65.

Conpes 3468, 2007. Consejo Nacional de Política Económica y Social, República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación, Política Nacional de Sanidad e Inocuidad para la Cadena Avícola. En: http://www.dnp.gov.co/archivos/documentos/Subdireccion_Conpes/3468.pdf

Dane. 2000-2004. Evaluaciones de producción de carne y huevo en la industria avícola del país. Revisión Colombiana

D'Aquila, R. T., Bechtel L. J., Videler J. A., Eron J. J., Gorczyca P., and Kaplan J. C. 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. Nucleic Acids Res. 19:3749.

D'Aoust, J. Y., Sewell, A.M., Daley, E., and Greco, P. 1989. Salmonella. pp. 327-445. In M.P. Doyle (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York.

Dane. 2000-2004. Evaluaciones de producción de carne y huevo en la industria avícola del país. Revisión Colombiana Dauga C., Zabrovskaja A., and P. A. D. Grimont. 1998. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of Salmonella enteric J. Clin. Microbiol. 36:2835-2843.

De La Hoz, A.L, Leal, A.L, Hidalgo, H. 2005. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de Salmonella typhi recuperados en el programa de vigilancia por el laboratorio de EDA en Colombia durante el periodo 1997-2003 mediante la electroforesis en campo pulsado. Acta Biológica Colombiana, Vol. 10 No. 1. En: <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/Resumenes/1001/Res05.pdf>

Dodson, S. V., Maurer, J. J., Holt P. S., and Lee M. D. 1999. Temporal changes in the population genetics of Salmonella pullorum. Avian Dis. 43:685- 695.

European Food Safety Authority, 2008. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: Salmonella prevalence estimates. The EFSA Journal (2008) 135, Pp.1-111.

FAO/OMS. 2002. Evaluaciones de riesgos de Salmonella en huevos y pollos. Serie Evaluación de riesgos microbiológicos; N° 1. En: http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_salmonella_es.asp

Kingsley, R. A., and Baumler A. J.. 2000. Host Adaptation and the emergence of infectious disease: the RFLP-PCR typing scheme for identifying poultry Salmonella serotypes 395 Salmonella paradigm. Mol. Microbiol. 36:1006-1014.
OIE. 2004. Manual de OIE sobre animales terrestres. Capitulo 2.10.3. Salmonelosis y su impacto sobre la industria avícola, Pp. 1092-1106.

Liu, T., Liljebjelke K., Bartlett E., Hofacre C., Sanchez S., and Maurer J. J.. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of Salmonella in poultry environment. J. Food Prot. 65:1227-1232.

Medici, D., Croci. L, Delibato. E., Pasquale. S., Filetici E, and Toti. L. 2003. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect Salmonella enteric Serotype Enteritidis in Poultry. Applied and Environmental Microbiology, June 2003, p. 3456-3461 Vol. 69, No. 6

Parra, F. 2004. Exclusión Competitiva en Salmonellosis: Revisión. Arbor Acres Farm Hattem, Holland. Ediciones Frankfurt. Pp. 125-156.

Sánchez, J. M. Cardona, N.M. 2003. Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal. Infectio; 7(1): 22-29.

Schlundt. J., Toyofuku. H., Jansen. J., and Herbst. S.A. 2004. Zoonosis emergentes transmitidas por vía alimentaria. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 23 (2), 513-533.

Uribe, C. Suarez, M. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a nivel de alimentos de origen aviar. Colombia Médica. Universidad Del Valle. 37:151-158.

World Health Organization. 1988. Salmonellosis control the rol of animal and product hygiene. Technical Report Series. #774. Geneva. Pp. 325-345.

Yang, H., Liu, T., Hofacre, C., Marier, M., White, D.G., Ayers, S., Wang, L and Maurere, J.J., 2003. A restriction fragment length polymorphism-based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identifying Salmonella serotypes. Avian Disease. 47: 387-393.