

Determinación, por PCR, de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A y *Salmonella* Issatschenko en muestras de pollitos infectados experimentalmente

Determination of *Salmonella* Enteritidis FT 13 A and *Salmonella* Issatschenko by PCR in samples of chicks experimentally infected

Israel Monroy Becerra* Néstor Ledesma Martínez*
Félix Domingo Sánchez Godoy* Griselda Ruiz Flores** Odette Urquiza Bravo*

Abstract

The objective of this work was to determine by PCR the presence of *Salmonella* Enteritidis FT-13A (SE) and *Salmonella* Issatschenko (SI) in different samples of organs from 4 days old chicks experimentally infected. Four days old chicks were inoculated with SE and SI and their organs were frozen for DNA extraction to perform classic and nested PCR. It was possible to demonstrate the presence of SE and SI after 6 hours after experimental infection (AEI), but as time passed AEI positive results were inconsistent, obtaining negative results until 174 hours AEI. PCR is useful for detecting SE and SI in the early hours AEI. It is recommended to use pre-enrichment of the samples, in order to facilitate the DNA extraction and the detection of *Salmonella* by PCR.

Key words: CLASSIC PCR, NESTED PCR, *SALMONELLA* ENTERITIDIS, *SALMONELLA* ISSATSCHENKO, CHICKS.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar por medio de esta prueba, la presencia de *Salmonella* Enteritidis FT-13A (SE) y de *Salmonella* Issatschenko (SI), en diferentes muestras de órganos de pollitos de 4 días de edad infectados experimentalmente. Se emplearon órganos congelados de pollitos de 4 días de edad inoculados experimentalmente con SE y SI, para extraer el ADN y realizar la PCR clásica y anidada. Se logró detectar SE y SI desde las 6 horas posinfección experimental (PIE), pero conforme pasó el tiempo PIE, los resultados positivos fueron inconsistentes, obteniendo resultados negativos hasta las 174 horas PIE. Se concluyó que la PCR es útil para detectar SE y SI en las primeras horas PIE. Se sugiere utilizar pre-enriquecimiento de las muestras, para facilitar la extracción de ADN y la detección de *Salmonella* por medio de la PCR.

Palabras clave: PCR CLÁSICA, PCR ANIDADA, *SALMONELLA* ENTERITIDIS, *SALMONELLA* ISSATSCHENKO, POLLITOS.

Recibido el 19 de julio de 2012 y aceptado el 20 de noviembre de 2012.

*Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

**Universidad Autónoma "Gabriel Rene Moreno", Facultad de Ciencias Veterinarias, Av. 26 de Febrero entre Av. Busch y Centenario, Santa Cruz de la Sierra-Bolivia.

Responsable de correspondencia: Israel Monroy Becerra, teléfono: 5622 5868, correo electrónico: dragonred003@hotmail.com

Nota: Este trabajo es resultado de la tesis, PCR SE y SI muestras de pollitos.

Introduction

Salmonella spp is a pathogen capable of infecting great variety of vertebrates. The infection caused by *Salmonella* in humans and domestic animals is still a serious worldwide problem.¹

Salmonella genus consists of only two species: *Salmonella bongori* and *Salmonella enterica*, the latter is divided into six subspecies: *S. enterica*, subsp. *enterica*; *S. enterica*, subsp. *salamae*; *S. enterica*, subsp. *arizonae*; *S. enterica*, subsp. *diarizonae*; *S. enterica*, subsp. *houstenae* and *S. enterica*, subsp. *indica*.^{2,4} Bourdenche *et al.*² mention the existence of 2 541 serovars for the Kauffmann-White scheme; however, as serovars do not have a taxonomic level of species, their names are written in Roman letters (not italic) and in capitals as in *Salmonella* Enteritidis, which corresponds to: “*Salmonella enterica*, subsp. *enterica*, serovar Enteritidis”, so for practical purposes it is used directly as *Salmonella* Enteritidis (SE).^{2,4}

Recently, an increase in cases of *Salmonella* Typhimurium (ST) and SE has been recorded in poultry farming. It has been suggested that some pests as rodents are carriers of both serovars.^{3,4}

Salmonellosis in rats can be a serious problem because it behaves as reservoir and vectors from having close coexistence with farmed poultry. In spite of the great number of studies that have been carried out for detection of *Salmonella*, including SE, there is little information on *Salmonella* Issatschenko (SI), which it has been demonstrated that affects family Muridae and broiler chicken;^{4,5} however, these studies have not included PCR.³

In literature, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* biovar Issatschenko (SI) has also been known as *S. Danysz*, *S. Gaerther*, *S. Liverpool*, *S. Ratin*, *S. Projorov* and *S. Enterica* serovar 17 F4, subgroup I, group D, which kills murines. This *Salmonella* has the same somatic and flagellar antigens as *S. Enteritidis* according to the Kauffman-White classification (group D, subgroup I, O: 1, 9, 12 and H: g, m) and the latter serovar affects all species, including humans.³

It must be mentioned that poultry products have been implicated as source of infections by SE serovars towards animal species, including humans.⁵ Conversely, it has been experimentally demonstrated that, when an inappropriate pest control has been carried out, there are numerous sources of infection by *Salmonella* in commercial chicken production units, as wild birds, arthropods and rodents, which contaminate water, food, bed material and equipment through feces, favoring the permanence of *Salmonella* in nature.^{6,7}

Introducción

Salmonella spp es un patógeno capaz de infectar una gran variedad de vertebrados. La infección producida por *Salmonella* en humanos y animales domésticos sigue siendo un serio problema en todo el mundo.¹

El género *Salmonella* consta de sólo dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última está dividida en seis subespecies: *S. enterica*, subsp. *enterica*, *S. enterica*, subsp. *salamae*, *S. enterica*, subsp. *arizonae*, *S. enterica*, subsp. *diarizonae*, *S. enterica*, subsp. *houstenae* y *S. enterica*, subsp. *indica*.^{2,4} Bourdenche *et al.*² mencionan la existencia de 2541 serovariedades para el esquema de Kauffmann-White; sin embargo, como las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres se escriben con letras romanas (no itálicas) y con mayúscula como en *Salmonella* Enteritidis, que corresponde a: “*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Enteritidis”, por lo que para fines prácticos se usa directamente *Salmonella* Enteritidis (SE).^{2,4}

Recientemente, en la avicultura se ha registrado un incremento de casos por *Salmonella* Typhimurium (ST) y por SE. Se ha sugerido que algunas plagas como los roedores son portadores de ambas serovariedades.^{3,4}

La salmonelosis en ratas puede ser un serio problema porque actúan como reservorio y vectores al tener convivencia estrecha con las aves de corral. A pesar del gran número de estudios que se realizan para la detección de *Salmonella*, incluyendo SE, existe poca información sobre *Salmonella* Issatschenko (SI), la cual se ha demostrado que afecta a la familia Muridae y a pollos de engorda;^{4,5} sin embargo, estos estudios no han incluido la PCR.³

En la literatura, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* biovar Issatschenko (SI), se ha conocido también con diversos nombres, como *S. Danysz*, *S. Gaerther*, *S. Liverpool*, *S. Ratin*, *S. Projorov* y *S. Enterica* serovariedad 17 F4, subgrupo I, grupo D, que mata a muridos. Esta *Salmonella* tiene los mismos antígenos somáticos y flagelares que *S. Enteritidis* según la clasificación de Kauffmann y White (grupo D, subgrupo I, O: 1, 9, 12 y H: g, m) y esta última serovariedad afecta a todas las especies, incluyendo al humano.³

Cabe mencionar que los productos avícolas han sido implicados como fuente de infecciones por las serovariedades de SE hacia especies animales, incluyendo al ser humano.⁵ Por otro lado, experimentalmente se ha demostrado que, cuando no se procede a un control adecuado de plagas, existen numerosas fuentes de infección de *Salmonella* en las unidades de producción de pollo comercial, como las aves silvestres, los artrópodos y los roedores, que contaminan el agua, el ali-

With regard to diagnosis, to date, more rapid and sensitive methods have been developed in different types of samples, such as plate agglutination test (PA),⁸⁻¹⁰ microagglutination test (MA),¹⁰ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),¹¹⁻¹³ fluorescent antibody tests (FA),^{11,12} and microantiglobulin test,¹⁰ which are capable to detect antibodies against *Salmonella*. With the use of bacteriological isolation it is possible to identify *Salmonella* by biochemical and serotyping tests. The current standard laboratory procedure for cultivating and identifying *Salmonella* serovars is laborious and can delay up to 7 days;^{8,9,14} however, on noticing certain histological lesions it is probable that such lesions are caused by *Salmonella*;¹⁵ DNA hybridization^{16,17} and polymerase chain reaction (PCR) delay approximately 24 to 48 hours, depending on the number of samples.^{18,19}

Classic PCR has been used for identifying several microbiological species without previous isolation, including *Salmonella*, from clinical samples and food.^{18,19}

PCR is a DNA copying method that can be used for being highly sensitive and specific for detection of microorganisms for a wide range of samples.

PCR sensitivity and specificity

Based on PCR tests of previous studies on the minimum detection concentration of *Salmonella* spp, it has been mentioned that there are factors that produce positive or negative false results due to high concentrations of bacterial and cellular DNA from biological samples and from the presence of inhibitory factors coming from the same samples, as for instance: hemoglobin, lactoferrin, polysaccharides, fats, proteins, freezing, among others.²¹⁻²⁵

Alva²⁶ mentioned that nested PCR sensitivity for SE detection is up to 10 colony forming units (CFU), considering that this test is useful for *Salmonella* spp diagnosis in poultry samples and negative samples to bacterial isolation. In order to perform PCR to detect *Salmonella*, primers that magnify a 485 to 525-bp invA gene fragment have been used.²⁶⁻³⁰

Due to *Salmonella* genus importance worldwide, it is necessary to find practical and rapid diagnostic techniques that allow the detection of *Salmonella* from different samples, for which the objective of the present study was to determine, by PCR, presence of *Salmonella* Enteritidis FT 13 A and *Salmonella* Issatschenko in different samples of organs from 4-day-old chicks experimentally infected, as well as its relationship with the bacteriologic isolation result and histological lesions described in a previous study.³

mento, el material de cama y el equipo a través de sus heces, favoreciendo la permanencia de *Salmonella* en la naturaleza.^{6,7}

Respecto al diagnóstico, a la fecha se han desarrollado métodos más rápidos y sensibles en distintos tipos de muestras, como aglutinación en placa (AP),⁸⁻¹⁰ prueba de microaglutinación (MA),¹⁰ *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA),¹¹⁻¹³ pruebas de anticuerpos fluorescentes (AF),^{8,11-13} prueba de inmunofluorescencia (IF),^{11,12} y prueba de microantiglobulina,¹⁰ las cuales son capaces de detectar anticuerpos contra *Salmonella*. Con el aislamiento bacteriológico es posible identificar *Salmonella* mediante pruebas bioquímicas y de serotipificación. El actual procedimiento de laboratorio estándar para cultivar e identificar las serovariedades de *Salmonella* es laborioso y puede tardar hasta 7 días;^{8,9,14} no obstante, al observar ciertas lesiones histológicas es probable sugerir que dichas lesiones son por *Salmonella*;¹⁵ la hibridación de ADN^{16,17} y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tardan aproximadamente de 24 a 48 horas, dependiendo del número de muestras que se trabajen.^{18,19}

La PCR clásica se ha aplicado para identificar varias especies microbiológicas sin previo aislamiento, incluyendo a *Salmonella*, a partir de muestras clínicas y de alimento.^{18,19}

La PCR es un método de copiado de ADN que puede emplearse por ser altamente sensible y específico en la detección de microorganismos en un amplio rango de muestras.^{18,20}

Sensibilidad y especificidad de la PCR

Con base en las pruebas de la PCR de trabajos anteriores sobre la detección de la concentración mínima detectable de *Salmonella* spp, se ha mencionado que existen factores que producen resultados falsos positivos o negativos debido a la alta concentración de ADN bacteriano y celular provenientes de las muestras biológicas, y por la presencia de factores inhibitorios provenientes de las mismas muestras, como puede ser la hemoglobina, lactoferrina, polisacáridos, grasas, proteínas, la congelación, entre otros.²¹⁻²⁵

Alva²⁶ mencionó que la sensibilidad de la PCR anidada para detectar SE es desde 10 unidades formadoras de colonia (UFC), considerando que esta prueba es útil para el diagnóstico de *Salmonella* spp en muestras provenientes de aves y muestras negativas al aislamiento bacteriano. Para la realización de la PCR para *Salmonella* se han empleado iniciadores que amplifican un fragmento de 485 a 525 pb del gen inv A.²⁶⁻³⁰

Debido a la importancia del género *Salmonella* en el mundo, es necesario encontrar técnicas de diagnóstico prácticas y rápidas que permitan la detección de

Material and methods

Samples

As part of the study of Ruiz *et al.*,³ samples of crop (C), heart (H), lung (L), liver (Li), spleen (S), duodenum (D), jejunum (J), ileum (I) and ceca (Ca) were used in six different time period: at 6, 18, 30, 42, 102 and 174 hours after oral experimental inoculation (AEI) of 4-day old Ross chicks infected with *Salmonella* Enteritidis FT 13 and *Salmonella* Issatschenko, obtaining a total of 42 samples of SE and SI that were storage at -20°C until used.

The positive control samples were obtained from the organs of SPF (specific pathogen free birds) chicks experimentally infected with SE [1×10^8] and SI [1×10^9] / ml by oral route. The negative controls were obtained from organs of 4-day-old SPF chicks inoculated with 250 μ l of physiological saline solution (PSS) by oral route.

Research design

Salmonella DNA extraction

Each sample by separate was processed as follows:

A 0.1 gram of each sample aforementioned was macerated. Each sample was homogenized with a Vortex AgitatorTM in 1 ml of sterile phosphate buffered solution (PBS) (0.324% of KH_2PO_4 ,* 1.08% of Na_2HPO_4 * and 16.1% of NaCl*); subsequently, 4 μ l of lysozyme** were added [20 mg/ml] obtaining a final volume of 1 004 μ l (80 μ g) and was incubated at 4°C for 45 minutes; sample sedimentation was allowed during 5 minutes and 250 μ l of the initial mixture were taken and transferred into another test tube, adding 12.5 μ l of proteinase K*** [20 mg/ml] and 250 μ l of STEP (10% of SDS,† TRIS* [1M] pH 8, EDTA† [0.5M] pH 8) and was incubated for 2 hours at 37°C; from the resultant volume (512.5 μ l) DNA purification was performed with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI) (phenol,** chloroform,*** isoamyl alcohol) and precipitated with ethanol. Later, the sample was centrifugated at $10\,205 \times g$ for 15 minutes at 4°C and the DNA tablet was dried at room temperature for two hours. Finally, DNA was resuspended in bidistilled water and incubated between 55 and 60°C° for 10 minutes.

Classic PCR

From the previous process, 5 μ l of DNA were taken and transferred into a PCR tube with 2 μ l of buffered solu-

Salmonella a partir de diferentes muestras, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar, por medio de la PCR, la presencia de *Salmonella* Enteritidis FT-13A y *Salmonella* Issatschenko en diferentes muestras de órganos de pollitos de 4 días de edad infectados experimentalmente, así como su relación con el resultado del aislamiento bacteriológico y las lesiones histológicas descritas en un trabajo previo.³

Material y métodos

Muestras

Como parte del estudio de Ruiz, *et al.*,³ se utilizaron muestras de buche (B), corazón (C), pulmón (P), hígado (H), bazo (B), duodeno (D), yeyuno (Y), íleon (I) y ciegos (Ci) en 6 tiempos: a las 6, 18, 30, 42, 102, 174 horas posinoculación experimental (PIE) vía oral de pollitos (Ross) de 4 días de edad infectados con *Salmonella* Enteritidis FT 13 y con *Salmonella* Issatschenko, para obtener un total de 42 muestras de SE y SI que fueron almacenadas a -20°C hasta su empleo.

Las muestras testigo positivas fueron de los mismos órganos de pollitos SPF (aves libres de patógenos específicos) infectados experimentalmente con SE [1×10^8] y SI [1×10^9] / ml por vía oral. Los testigos negativos se obtuvieron a partir de órganos de pollitos de 4 días de edad con una inoculación de 250 μ l de solución salina fisiológica (SSF) por vía oral en pollitos SPF.

Diseño de investigación

Extracción de ADN de Salmonella

Cada muestra por separado fue procesada de la siguiente manera:

Se maceró 0.1 gramo de cada muestra anteriormente mencionada. Cada muestra fue homogeneizada mediante el uso de un agitador tipo vortex en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril (0.324% de KH_2PO_4 ,* 1.08% de Na_2HPO_4 * y 16.1% de NaCl*), posteriormente se agregan 4 μ l de lisozima** [20 mg/ml] para tener un volumen final de 1004 μ l (80 μ g), se incubó a 4°C durante 45 minutos; se dejó sedimentar la muestra 5 minutos y se tomaron 250 μ l de la mezcla inicial para depositarla en otro tubo al cual se adicionaron 12.5 μ l de proteinasa K*** [20 mg/ml] y 250 μ l de solución STEP (10 % de SDS,†

*J.T.Baker 55320, Xalostoc, Edo de Méx. México; (KH_2PO_4 Cat. 3246-01), (Na_2HPO_4 Cat. 3828-01), (NaCl CaT. 3625-01).

**Sigma, St. Louis, MO63103, Estados Unidos de América.

***Fermentas International INC, Ontario L7N 3N4, Canadá.

†Research Organics, Inc, Cleveland, Ohio 44125, Estados Unidos de América.

tion† for PCR [1X], 0.4 µl of deoxynucleoside triphosphate† (dNTP's) [0.2 mM], 2 µl of primers°° [1 mM], 1.2 µl of MgCl† [1.5 mM], 0.5 µl of Taq polymerase† [2.5 unities] and 8.9 µl of bidistilled water.³⁰ The following primers were used in PCR: *inv1F*: 5'CGT CAT TCC ATT ACC TAC CT-3' and *inv1R*: 5'- CAA TAG CGT CAC CTT TGA TA-3', which amplified 525bp *invA* gene fragment,^{26,30} using the following protocol: a cycle of 95°C for 5 minutes, 30 cycles at 93°C for 45 seconds, 59°C for 5 seconds, 72°C for 45 seconds, followed by a final extension at 72°C for 4 minutes.^{°° 30}

Nested PCR

From the previous PCR, 5 µl were taken and suspended in 2 µl of buffered solution for PCR† [1X], 0.4 µl of dNTP's† [0.2 mM] 1 µl of primers°° [0.5 mM] 1.2 µl of MgCl† [1.5 mM], 1 µl of Triton‡ [0.10%], 0.3 µl of BSA† [0.15 mg/ml bovine serum albumin, 0.5 µl of Tap polymerase† [2.5 unities] and 8.6 µl of bidistilled water. The following primers were used for this process: *inv2F*: 5'- TGG TGT TTA TGG GGT CGT TCT A 3' and *inv2R*: 5'- CCT TCA AAT CGG CAT CAA TAC TC-3', which amplified 329-bp *invA* gene fragment.^{26,30}

A denaturalization cycle°° was performed at 95°C for 5 minutes, 30 cycles at 92°C for 45 seconds, 65°C for 45 seconds, 72°C for 45 seconds, followed by a final extension of 4 minutes at 72°C.

After classic and nested PCR was performed, 1 µl of bromophenol blue was added to the 3 µl samples* and each one was separated on 2% agarose gel; a 622-bp (base pairs) molecular size marker was placed in each gel** in order to carry out electrophoresis*** for 30 minutes at 80 volts. Later, gels were stained with ethidium bromide† and were observed by ultraviolet light.‡

Statistical analysis

The 2 × 2 contingency tables were elaborated, for SE FT 13 A and SI, for calculating sensitivity and specificity of PCR in this study with regard to bacteriology⁴ and histopathology⁴ with respect to bacteriology.⁴ Chi-square test was used for determining the relationship between tests.³¹

Results

Salmonella Enteritidis FT 13 A

Classic PCR

PCR test using *inv1F* and *inv1R* primers that amplify a 525-bp *invA* gene fragment, resulted negative for *Sal-*

TRIS* [1M] pH8, EDTA** [0.5M] pH 8), se incubó por 2 horas a 37°C; del volumen resultante (512.5 µl) se realizó la purificación de ADN con fenol-cloroformo isoamílico (FCI) (Fenol,*** Cloroformo,† Alcohol Isoamílico***) y se precipitó con etanol. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10 205 x g durante 15 minutos a 4°C y se secó la pastilla de ADN a temperatura ambiente durante dos horas. Finalmente, el ADN fue resuspendido en agua bidestilada y se incubó entre 55 y 60°C‡ durante 10 minutos.

PCR clásica

Se tomaron 5 µl de ADN del proceso anterior y se pasaron a un tubo de PCR con 2 µl de solución amortiguadora‡ para PCR [1X], 0.4 µl de desoxinucleótidos trifosfatados• (dNTP's) [0.2 mM], 2 µl de iniciadores•• [1 mM], 1.2 µl de MgCl• [1.5 mM], 0.5 µl de Taq polimerasa• [2.5 unidades] y 8.9 µl de agua bidestilada.³⁰

En la PCR se utilizaron los siguientes iniciadores: *inv1F*: 5'-CGT CAT TCC ATT ACC TAC CT-3' e *inv1R*: 5'- CAA TAG CGT CAC CTT TGA TA-3', que amplificaron un segmento del gen *invA* de 525 pb,^{26,30} con el siguiente protocolo: un ciclo de 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 93°C durante 45 segundos, 59°C 45 segundos, 72°C 45 segundos, seguida de una extensión final a 72°C por 4 minutos.♦³⁰

PCR anidada

Se tomaron 5 µl de la PCR anterior y se suspendieron con 2 µl de solución amortiguadora para la PCR• [1X], 0.4 µl de dNTP's [0.2 mM] 1 µl de iniciadores♦♦ [0.5 mM] 1.2 µl de MgCl• [1.5 mM] , 1 µl de Triton♦♦ [0.10%], 0.3 µl de BSA‡ [0.15 mg/ml Albúmina Sérica Bovina], 0.5 µl de Tap polimerasa• [2.5 unidades] y 8.6 µl de agua bidestilada. Para este proceso se utilizaron los siguientes iniciadores: *inv2F*: 5'-TGG TGT TTA TGG GGT CGT TCT A 3' e *inv2R*: 5'-CCT TCA AAT CGG CAT CAA TAC TC-3', que amplificó un segmento del gen *invA* de 329 pb.^{26,30}

Se realizó un ciclo de desnaturalización♦♦ de 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 92°C durante 45 segundos, 65°C 45 segundos, 72°C 45 segundos, seguida de una extensión final de 4 minutos a 72°C.

*GIBCO, Life Technologies, Grand Island, N.Y. 14072, Estados Unidos de América.

**Research Organics, Inc, Cleveland, Ohio 44125, Estados Unidos de América

***J.T. Baker Phillipsburg, NJ 08865, Estados Unidos de América.

†Caledon Laboratories, Otn., Canada L7G 4R9.

‡Labnet International, Inc, Woodbridge, NJ 07095, Estados Unidos de América

•Fermentas International Inc, Ontario L7N 3N4, Canadá.

••Bio Synthesis Lewisville, TX, Estados Unidos de América.

♦Thermo Hybaid limited, Reino Unido.

♦♦Sigma Chemical CO St. Louis, Estados Unidos de América.

monella Enteritidis FT 13 A in all organs and times of sampling.

Nested PCR

Positive results were found with *inv2F* and *inv2R* primers that amplify a 329-bp *invA* gene fragment from 6 hours AEI to 174 hours AEI in the different samples (Table 1 and Figure 1).

Salmonella Issatschenko

Classic PCR

PCR test for 525-bp fragment was positive from 6 hours until 30 hours AEI; however, other samples and times resulted negative (Figure 2).

Nested PCR

PCR tests for 329-bp fragment were positive from 6 hours AEI in different organ samples until 174 hours. However, positive results were variable between the different organs of the present study and AEI times (Table 2 and Figure 3).

Coincidence tests

Salmonella Enteritidis FT 13 A

In the case of *Salmonella* Enteritidis, after 6 hours AEI there was 29% of coincidence between nested PCR and bacterial isolation. After 18 hours AEI: PCR and bacteriology 14%, bacteriology and histopathology 43%. At 30 hours AEI, histopathology obtained 0% of coincidences with PCR, whereas 86% of coincidence was obtained with bacteriology and PCR.

Salmonella Issatschenko

In the case of *Salmonella* Issatschenko, after 6 hours AEI there was 43% of coincidence, both in nested PCR and bacteriology. At 18 hours AEI, coincidences between histopathology and nested PCR were 100%, and coincidence between bacteriology and PCR was 14%. After 30 hours AEI, coincidence tests were: between histopathology and PCR 100% and between bacteriology and PCR 0%.

Relationship between test results

The 2×2 contingency table for SE FT 13 A, by comparing PCR with bacteriology, 25% of sensitivity and

Después de la realización de la PCR clásica y anidada, a las muestras de 3 µl se les agregó 1 µl de Azul de Bromofenol* y se depositó cada una por separado en geles de agarosa al 2%; se colocó en cada gel un marcador de tamaño molecular** de 622 pb (pares de bases) para llevar a cabo la electroforesis*** durante 30 min a 80 voltios. Posteriormente, los geles se tiñeron con Bromuro de etidio† y se visualizaron mediante luz ultravioleta.‡

Análisis estadístico

Se elaboraron tablas de contingencia 2×2 , para SEFT13A y SI, para calcular sensibilidad y especificidad de la PCR de este trabajo con respecto de la bacteriología⁴ y para histopatología⁴ con respecto de la bacteriología.⁴ Para determinar la relación entre las pruebas se usó el método de Ji^{2, 31}

Resultados

Salmonella Enteritidis FT 13 A

PCR clásica

La prueba de la PCR utilizando los iniciadores *inv1F* e *inv1R* que amplifican un fragmento de 525 pb del gen *invA*, resultó negativa para *Salmonella* Enteritidis FT 13 A en todos los órganos y tiempos de muestreo.

PCR anidada

Se encontraron resultados positivos con los iniciadores *inv2F* e *inv2R* que amplifican un fragmento de 329 pb del gen *invA* desde las 6 horas PIE hasta las 174 horas PIE en las diferentes muestras (Cuadro 1 y Figura 1).

Salmonella Issatschenko

PCR clásica

La prueba de PCR para el fragmento de 525 pb fue positivo a partir de las 6 horas hasta la hora 30 posinfección; sin embargo, las demás muestras y tiempos resultaron negativos (Figura 2).

*Fermentas International Inc, Ontario L7N 3N4, Canadá.

**Biogenica, Miami, FL 33186, Estados Unidos de América.

***Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Warwickshire, Reino Unido.

†Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo 63178, Estados Unidos de América.

‡Upland, CD 9178, Estados Unidos de América.

CUADRO 1

Resultados de la PCR anidada de *Salmonella* Enteritidis FT 13Nested PCR results of *Salmonella* Enteritidis FT 13

Nested PCR				Organs			
Hours AEI	Crop	Heart/lung	Liver/spleen	Duodenum	Jejunum	Ileum	Ceca
6	+	+	-	+	+	-	+
18	+	+	+	+	-	+	+
30	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	+	-	+	-
102	-	+	-	-	-	-	+
174	-	-	+	-	+	-	-

AEI: after oral experimental infection

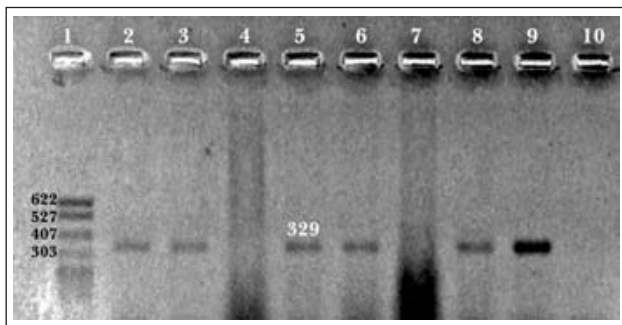


FIGURA 1. Resultados de la PCR, positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 íleon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, a las 6 horas PIE.

FIGURE 1. Positive PCR results to 329-bp fragment of SE FT 13 A in agarose gel stained with ethidium bromide. Lane: 1, molecular weight marker; 2, crop; 3, heart-lung; 4, liver-spleen; 5, duodenum; 6, jejunum; 7, ileum; 8, ceca; 9 positive control and 10, negative control, at 6 hours AEI.

54% of specificity was obtained (Table 3). By comparing the histological study with the bacteriologic, 100% of sensitivity and 12% of specificity was found (Table 4), and in the contingency table of histopathology in regard with PCR, sensitivity was 33% and a specificity of 0% (Table 5).

The results for SI in the 2×2 contingency table, comparing PCR with bacteriology, 13% was for sensitivity and 44% for specificity (Table 6). By comparing histopathology with bacteriology with respect to bacteriology, 100% of sensitivity and 12% specificity was found (Table 7). In the contingency table of *Salmonella* Issatschenko, for histopathological studies and PCR, a sensitivity of 47% and specificity of 50% was recorded (Table 8).

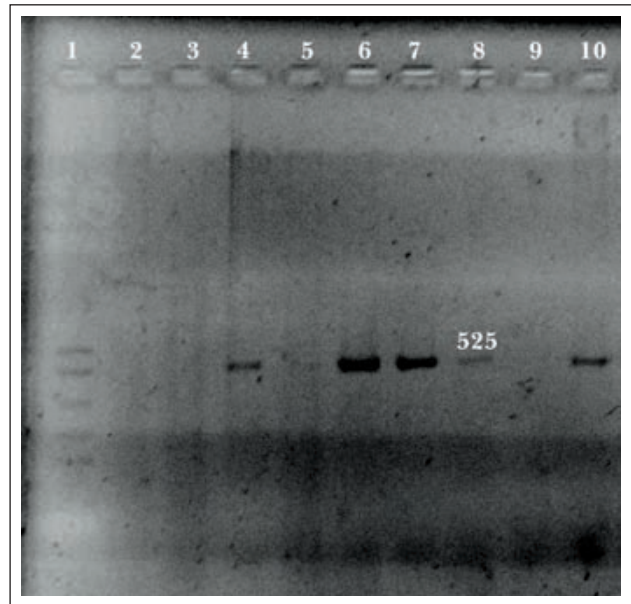


FIGURA 2. Resultados de la PCR positivos al fragmento 525 pb de SI en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 íleon, 8 ciegos, 9 testigo negativo, 10 testigo positivo, a las 18 horas PIE.

FIGURE 2. Positive PCR results to 525-bp fragment of SI in agarose gel stained with ethidium bromide. Lane: 1, molecular weight marker; 2, crop; 3, heart-lung; 4, liver-spleen; 5, duodenum; 6, jejunum; 7, ileum; 8, ceca; 9, negative control and 10, positive control, at 18 hours AEI.

PCR anidada

Se observaron resultados positivos al fragmento de 329 pb a partir de las 6 horas PIE en las diferentes muestras de los órganos hasta las 174 horas. No obstante, los resultados positivos fueron variables entre los diferentes órganos del presente estudio y los tiempos PIE (Cuadro 2 y Figura 3).

Chi-square test

The chi-square test found that PCR and bacteriology were heterogeneous in the case of *Salmonella* Enteritidis FT 13 A ($P < 0.05$). The histopathology and PCR were homogeneous ($P < 0.05$).

For *Salmonella* Issatschenko, in chi-square test it was found that PCR and bacteriology were homogeneous ($P < 0.05$). The histopathology and PCR were heterogeneous ($P < 0.05$).

Discussion

With advances in molecular biology, particularly in the development of tests such as PCR, a sensitive and specific alternative is offered for the diagnosis of infectious diseases.

Classic PCR results for SE and SI were negative, probably due to several factors, such as the presence of inhibitory substances: hemoglobin, lactoferrin, polysaccharides and fats or proteins,²¹⁻²⁵ because they can cause problems by detecting pathogen organisms in clinical samples or in the environment. Other factor that could complicate PCR is heme group and its metabolites.²⁵ Although that does not indicate that posi-

Coincidencias de las pruebas

Salmonella Enteritidis FT 13 A

En el caso de *Salmonella* Enteritidis, a las 6 horas PIE hubo 29% de coincidencia entre la PCR anidada y el aislamiento bacteriano. A partir de las 18 horas PIE: entre la PCR y la bacteriología, 14%; la bacteriología y la histopatología, 43%. A las 30 horas PIE la histopatología obtuvo 0% de coincidencia con la PCR, mientras que con la bacteriología y la PCR se obtuvo 86% de coincidencia.

Salmonella Issatschenko

En el caso de *Salmonella* Issatschenko, a las 6 horas PIE hubo 43% de coincidencias, tanto en la PCR anidada como en la bacteriología. A las 18 horas posinfección, la coincidencia entre la histopatología y la PCR anidada fue de 100%, y la coincidencia entre la bacteriología y la PCR fue de 14%. Después de 30 horas posinfección, las coincidencias de las pruebas fueron: entre la histopatología y la PCR 100% y entre la bacteriología y la PCR, de 0%.

CUADRO 2

Resultados de la PCR anidada de *Salmonella* Issatschenko
Nested PCR results of *Salmonella* Issatschenko

Nested PCR				Organs			
Hours AEI	Crop	Heart/lung	Liver/spleen	Duodenum	Jejunum	Ileum	Ceca
6	+	+	-	-	+	-	+
18	+	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	+	+	+	+
42	-	+	+	-	-	-	-
102	-	-	+	-	-	-	-
174	+	-	-	-	-	-	-

AEI: after oral experimental infection.

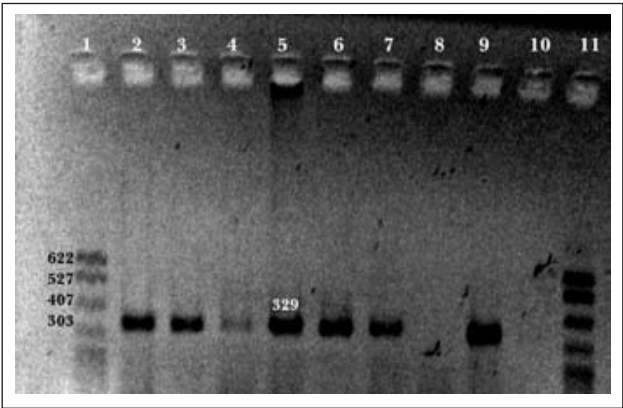


FIGURA 3. Resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SI en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 18 horas PIE.

FIGURE 3. Positive results to 329-bp fragment of SI in agarose gel stained with ethidium bromide. Lane: 1, molecular weight marker; 2, crop; 3, heart-lung; 4, liver-spleen; 5, duodenum; 6, jejunum; 7, ileum; 8, ceca; 9, positive control; 10, negative control and 11, molecular weight marker, at 18 hours AEI.

tive samples by classic PCR had been detected, and neither implies that there was no amplification, merely that it was not detected by this method, since nested PCR did gave positive results.

With respect to the nested PCR, for SE FT 13 A and SI, the results obtained were: greater number of positive samples by nested PCR than by classic PCR; coinciding with this the findings of Rychlik *et al.*,³⁰ who used bird feces samples of *Salmonella* free, which were contaminated with a known number of *Salmonella* Typhimurium F98 and homogenized for performance of PCR with the same primers used in this study. Rychlik *et al.*³⁰ obtained a product different from the present study (485-bp for classic PCR and 284-bp for nested PCR) and used a pre-enrichment with buffered peptone water and semi-selective Rappaport-Vassiliadis broth for 24 hours, obtaining 1000-fold sensitivity increase compared with the result of a classic PCR.

Usually, the nested PCR increases 1000 times more sensitivity, compared with the results of only one am-

CUADRO 3

Resultados de la tabla de contingencias 2×2 entre la bacteriología y la PCR, de las muestras del estudio de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A

Results of 2×2 contingency table between bacteriology and PCR, of *Salmonella* Enteritidis FT 13 A samples being studied

		<i>Bacteriology</i>		<i>Total</i>
		+	-	
PCR	+	4	12	16
	-	12	14	26
Total		16	26	42

Sensitivity	25%
Specificity	54%

CUADRO 5

Resultados de las contingencias 2×2 entre la histopatología y la PCR, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A

Results of 2×2 contingency table between histopathology and PCR, of all *Salmonella* Enteritidis FT 13 A samples being studied

		<i>Histopathology</i>		<i>Total</i>
		+	-	
PCR	+	13	3	16
	-	26	0	26
Total		39	3	42

Sensitivity	33%
Specificity	0%

Relación de los resultados de las pruebas

La tabla de contingencia 2×2 , para SE FT 13 A, al comparar la PCR con la bacteriología se obtuvo 25% de sensibilidad y 54% de especificidad (Cuadro 3). Al comparar el estudio histológico con el bacteriológico se encontró una sensibilidad de 100% y 12% de especificidad (Cuadro 4), y en la tabla de contingencias de la histopatología con respecto a la PCR, la sensibilidad fue de 33% y la especificidad, de 0% (Cuadro 5).

Los resultados para SI en la tabla de contingencias de 2×2 , comparando la PCR con la bacteriología, fue de 13% para la sensibilidad y de 44% para la especificidad (Cuadro 6). Al comparar la histopatología con respecto de la bacteriología se encontró sensibilidad de 100% y 12% de especificidad (Cuadro 7). En la tabla de contingencias de *Salmonella* Issatschenko, para los estudios histopatológicos y la PCR, se registró una

CUADRO 4

Resultados de la tabla de contingencias 2×2 entre la bacteriología e histopatología, de las muestras del estudio de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A

Results of 2×2 contingency table between bacteriology and histopathology, of *Salmonella* Enteritidis FT 13 A samples being studied

		<i>Bacteriology</i>		<i>Total</i>
		+	-	
Histopathology	+	16	23	39
	-	0	3	3
Total		16	26	42

Sensitivity	100%
Specificity	12%

CUADRO 6

Resultados de las contingencias 2×2 entre la bacteriología y la PCR, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Issatschenko

Results of 2×2 contingency table between bacteriology and PCR, of all *Salmonella* Issatschenko samples being studied

		<i>Bacteriology</i>		<i>Total</i>
		+	-	
PCR	+	1	19	20
	-	7	15	22
Total		8	34	42

Sensitivity	13%
Specificity	44%

CUADRO 7

Resultados de las contingencias 2×2 entre la bacteriología e histopatología, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Issatschenko

Results of 2×2 contingency table between bacteriology and histopathology, of all *Salmonella* Issatschenko samples being studied

		Bacteriology		Total
		+	-	
Histopathology	+	8	30	38
	-	0	4	4
Total		8	34	42

Sensitivity	100%
Specificity	12%

plification;¹⁹ however, in this study, after standardizing the protocol for fecal PCR, it was decided to test it in meat samples. The sensitivity of classic PCR was only 10 times more, compared with the results of the standard culture method for the detection of *Salmonella*.

Myint *et al.*³² reported that the pre-enrichment of the samples, both in ground meat and manure, as well as in organs, improve significantly the performance of the test. In the present study, the pre-enrichment was not used in search of a rapid alternative to diagnosis, since the pre-enrichment delays at least 24 hours.^{17-19,32-36}

Salmonella Enteritidis FT 13 A

In the present study, positive results of different organ samples, at 6 hours AEI, were obtained with the nested PCR; however, the results obtained were variable between organs and time period from 30 hours AEI. The aforementioned coincides with the results of the histopathologic studies obtained from the study of Ruiz *et al.*,³ which reflected lesions from 6 hours AEI, whereas the bacterial isolation resulted negative.

Similar results were obtained by Deng *et al.*³⁷ who performed real-time PCR and used duodenum, jejunum, ileum, ceca, also included in the present study. These authors revealed that from 8 hours AEI, positive results by real-time PCR started to appear and at 36 hours AEI, greater quantity of SE from the aforementioned organs were obtained.

In the bacteriologic study of Ruiz *et al.*,³ positive isolates from 18 hours AEI were obtained, depending on the tissue, similar to the study of Turnbull and Snoeyenbos,³⁸ in which birds of different ages were used (1-day-old, 2 weeks, 6 and 9 months), inoculated with 10^6 cells of SE, at 24 hours of their arrival to the farm.

CUADRO 8

Resultados de las contingencias 2×2 entre la histopatología y la PCR, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Issatschenko

Results of 2×2 contingency table between histopathology and PCR, of all *Salmonella* Issatschenko samples being studied

		Bacteriology		Total
		+	-	
PCR	+	18	2	20
	-	20	2	22
Total		38	4	42

Sensitivity	47%
Specificity	50%

sensibilidad de 47% y una especificidad de 50% (Cuadro 8).

Estadístico J^2

En la prueba de J^2 se encontró que la PCR y la bacteriología fueron heterogéneas en el caso de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A ($P < 0.05$). La histopatología y la PCR fueron homogéneas ($P < 0.05$).

Para *Salmonella* Issatschenko, en la prueba de J^2 se encontró que la PCR y la bacteriología fueron homogéneas ($P < 0.05$). La histopatología y la PCR fueron heterogéneas ($P < 0.05$).

Discusión

Con los avances en biología molecular, particularmente con el desarrollo de pruebas como la PCR, se ofrece una alternativa sensible y específica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Los resultados de la PCR clásica para SE y SI fueron negativos, debido probablemente a diversos factores, como la presencia de sustancias inhibitorias: la hemoglobina, la lactoferrina, los polisacáridos, las grasas o proteínas,²¹⁻²⁵ debido a que pueden ocasionar problemas al detectar organismos patógenos de muestras clínicas o ambientales. Otro factor que pudiera complicar la PCR es el grupo heme y sus metabolitos.²⁵ Aunque ello no indica que no se hayan detectado muestras positivas en la PCR clásica, y tampoco implica que no haya habido amplificación, simplemente que no fue detectada por este método, ya que la PCR anidada sí dio resultados positivos.

En cuanto a la PCR anidada, tanto para SE FT 13 A como para SI, los resultados obtenidos fueron: mayor número de muestras positivas con la PCR anidada que

Samples of blood, liver, spleen, duodenum, jejunum, ileum, ileo-cecal junction and ceca, at different time periods according to the group, which, in average, were: 3, 5, 10, 24 48 and 72 hours. In first hours AEI, isolation results were variable within groups and collected organs, but there were coincidences in isolates after 3 hours AEI.

Salmonella Issatschenko

In the case of this bacterium, findings were similar to SE FT 13 A, by classic and nested PCR, possibly because their virulence mechanisms can be similar, as mentioned by Poppe *et al.*,³⁹ Montenegro *et al.*,⁴⁰ Gulic,⁴¹ and Poppe *et al.*,⁴² who described that virulence associated with plasmids from different *Salmonella* serotypes possess similar gene sequences, but the mechanisms for which they contribute to virulence have not been studied in detail.^{41,43,44} Montenegro⁴⁰ suggested that *Salmonella* spp virulence plasmids could be acquired from systemic infections in humans and animals.

Coincidence between nested PCR, bacteriologic isolation and histological lesions

Salmonella Enteritidis FT 13 A

The coincidences between nested PCR tests and bacteriological studies indicated that there was 29% relationship in samples from 6 hours AEI, and 25% sensitivity and 54% specificity, respectively, which reflects a low relationship between both tests according the present study. Concerning Whyte *et al.*,¹⁸ they reported that by using both previous techniques it is possible to achieve a more precise evaluation of contaminated samples.

Sensitivity and specificity resulted low in the previous study, in contrast to the study of Perez *et al.*,⁴³ in which, by using the same statistical method of 2×2 contingency tables, they obtained 70.83% of sensitivity between two PCR tests and 100% of specificity, in contrast with the study of Myint *et al.*,³² who, by using nested PCR tests with and without the pre-enrichment, they obtained different results, the sensitivity of PCR without the pre-enrichment was 0% and the specificity was 100%, but using the pre-enrichment in the samples they obtained a sensitivity of 79 to 100%, and a specificity of 100% for the three enrichment mediums: peptone buffered water, Rappaport Vassiliadis and tetrathionate broth base Hajna.

con la PCR clásica; coincidiendo en ello con los hallazgos de Rychlik *et al.*,³⁰ quienes emplearon muestras de heces de aves libres de *Salmonella*, que fueron contaminadas experimentalmente con un número conocido de *Salmonella* Thyphimurium F98 y homogeneizadas para llevar a cabo la PCR con los mismos iniciadores que se utilizaron en el presente trabajo. Rychlik *et al.*³⁰ obtuvieron un producto diferente al del presente trabajo (485 pb para la PCR clásica y 284 pb para la PCR anidada) y además utilizaron un pre-enriquecimiento con agua peptonada amortiguada y caldo semi-selectivo Rappaport-Vassiliadis por 24 horas, con lo cual obtuvieron un incremento en la sensibilidad de 1000 veces, comparado con el resultado de una PCR clásica.

La PCR anidada, usualmente, incrementa la sensibilidad 1000 veces, comparada con los resultados de una sola amplificación;¹⁹ sin embargo, en ese estudio, después de estandarizar el protocolo para la PCR de heces, decidieron probarlo en muestras de carne. La sensibilidad de la PCR clásica sólo fue de 10 veces, comparada con los resultados del método de cultivo estándar para la detección de *Salmonella*.

Myint *et al.*³² indicaron que el pre-enriquecimiento de las muestras, tanto de carne molida y excretas como de órganos, mejoran significativamente el desempeño de la prueba. En el presente estudio no se utilizó el pre-enriquecimiento al buscar una alternativa de diagnóstico que fuera más rápida, ya que el pre enriquecimiento demora al menos 24 horas.^{17-19,32-36}

Salmonella Enteritidis FT 13 A

En este trabajo se obtuvieron resultados positivos a la PCR anidada de muestras de diferentes órganos desde las 6 horas PIE; sin embargo, a partir de las 30 horas PIE los resultados obtenidos fueron muy variables entre los diferentes órganos y tiempos. Lo anterior coincide con los resultados de los estudios histopatológicos obtenidos en el trabajo de Ruiz *et al.*,³ que reflejaron lesiones desde las 6 horas PIE, mientras que el aislamiento bacteriano resultó negativo.

Similares resultados obtuvieron Deng *et al.*,³⁷ quienes realizaron la PCR en tiempo real y utilizaron muestras de duodeno, yeyuno, íleon y ciego, incluidos también en el presente trabajo. Estos autores revelaron que a partir de las 8 horas PIE comenzaron a presentar resultados positivos por medio de la PCR en tiempo real, y a las 36 horas PIE fue donde se obtuvo mayor cantidad de SE a partir de los órganos anteriormente mencionados.

En el estudio bacteriológico de Ruiz *et al.*,³ se obtuvieron aislamientos positivos a partir de las 18 horas PIE, dependiendo del tejido, similar al trabajo de Turnbull y Snoeyenbos,³⁸ en el que se utilizaron aves

Salmonella Issatschenko

In the present study, nested PCR coincidences compared with the bacteriologic analysis for SI were different from SE. The peak of the positive results for SI, in the case of the nested PCR, was at 30 hours. As AEI time passed, positive results of the nested PCR decreased until there was no positive sample. In contrast, the study carried out by Ruiz *et al.*,³ where they used SI, showed positive isolates at 42, 150, 174 and 222 hours AEI, whereas in the histological lesion observations, the peak was from 30 hours AEI.

The sensitivity and specificity of PCR tests and the bacteriologic studies of the present work were 13% and 43%, respectively, whereas Schrank *et al.*⁴⁵ recorded a sensitivity of 47%. In these two tests, different pre-enrichment mediums for *Salmonella* Typhimurium and SE were compared.

Scharank *et al.*⁴⁵ observed that sensitivity was higher than the obtained in the present study and concluded that the tetrathionate broth is more efficacious than selenite cystine broth.

It has been observed that by using the PCR test, inconsistent results are obtained when *Salmonella* genus is used, for which Poppe *et al.*³⁵ suggested to carry out tests such as microagglutination, which gives 81% of sensitivity and 24% of specificity.

Salmonella Enteritidis FT 13 A

In the present study, by comparing histopathology with nested PCR, sensitivity was 33% and specificity of 0%, for which this test was more sensitive than bacteriology for determining the presence of *Salmonella* spp in the organs at different times, but less specific. Ruiz *et al.*³ found histological lesions from 6 hours AEI in chicks, primarily in ileum and ceca portions, corroborating by using electron microscopy the presence of SE FT 13 A. Kinde *et al.*,⁴⁴ from organs of infected hens with SE FT 4, by oral and intravenous route, concluded that birds inoculated with a field strain showed tissue positivity for a short period of time, and that *Salmonella* disappeared in the majority, after 8 days of inoculation. The isolates of SE were more frequent when lesions were evident; also, it was demonstrated that the percentage of positive birds to culture did not show significant differences ($P > 0.05$).

In contrast with the positive results of the present study by nested PCR, by relating them with bacteriologic and histopathologic findings, it was observed that histopathology is more sensitive, but less specific; whereas bacteriology is less sensitive, but more specific.

In the case of SI and based on the study of Kinde *et al.*,⁴⁴ the findings of Ruiz *et al.*³ and the obtained in

de diferentes edades (1 día de edad, 2 semanas, 6 y 9 meses), inoculadas con 10^6 células de SE, a las 24 horas de su llegada a la granja. Se tomaron muestras de sangre, hígado, bazo, duodeno, yeyuno, íleon, unión íleon-cecal y ciegos, a diferentes tiempos según el grupo, que, en promedio, fueron de 3,5,10,24,48 y 72 h. PIE. En las primeras horas PIE, los resultados de los aislamientos fueron variables dentro de los grupos y los órganos recolectados, pero hubo coincidencias en los aislamientos después de 3 horas PIE.

Salmonella Issatschenko

En el caso de esta bacteria, los hallazgos fueron similares a SE FT 13 A, con la prueba de la PCR clásica y anidada, debido posiblemente a que sus mecanismos de virulencia pueden ser similares, como lo mencionaron Poppe *et al.*,³⁹ Montenegro,⁴⁰ Gulic,⁴¹ y Poppe *et al.*,⁴² quienes describieron que la virulencia asociada con plásmidos de diferentes serotipos de *Salmonella* poseen secuencias de genes similares, pero los mecanismos por los que estos genes contribuyen a la virulencia no están estudiados con detalle.^{41,43,44} Montenegro⁴⁰ sugirió que los plásmidos de virulencia de *Salmonella* spp podrían ser adquiridos a partir de infecciones sistémicas en seres humanos y animales.

Coincidencias entre la PCR anidada y el aislamiento bacteriológico y lesiones histológicas

Salmonella Enteritidis FT 13 A

Las coincidencias entre las pruebas de la PCR anidada y los estudios bacteriológicos indicaron que hubo una relación de 29% en las muestras a las 6 horas post-infección, además de la sensibilidad de 25% y una especificidad de 54%, respectivamente, lo que refleja una relación baja entre las dos pruebas según las condiciones de este estudio. Al respecto, Whyte *et al.*¹⁸ mencionaron que al utilizar las dos técnicas anteriores es posible lograr una evaluación más precisa de muestras contaminadas.

La sensibilidad y especificidad resultaron bajas en el presente estudio, en comparación con el trabajo de Pérez *et al.*,⁴³ en el que, utilizando el mismo método estadístico de tabla de contingencias de 2×2 , obtuvieron una sensibilidad de 70.83% entre dos pruebas de PCR, y una especificidad de 100%, en comparación con el trabajo de Myint *et al.*,³² quienes, utilizando pruebas de PCR anidada con y sin pre-enriquecimiento, obtuvieron resultados diferentes; la sensibilidad de la PCR sin pre-enriquecimiento fue de 0% y la especificidad de 100%, pero al usar el

the present work, it is revealed that histological lesion observations were more sensitive than the bacteriologic studies for detecting microorganism damage in tissues, and thanks to nested PCR performed in this study, *Salmonella* was detected in the first hours AEI, reflected in greater quantity of positive samples than bacteriology.

The nested PCR technique detected *Salmonella*, but only during the first hours AEI.

The relationship between nested PCR results, histopathology and bacteriology presents variations in function of postinoculation time and the bacterium being studied.

The pre-enrichment of samples is recommended to obtain results by classic PCR.

Referencias

- LIBBY SJ, HALSEY TA, ALTIER C, POTTER J, GYLES CL. *Salmonella*. In: GYLES CL, PRESCOTT FL, SONGER JG, THOEN CO, editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3rt. ed. Ames, Iowa: Blackwell publishing, 2004.
- BOURDENCHE M, ROGGENTIN P, MIKOLEIT M, I. FIELDS P, BOCKEMÜHL J et al. Supplement 2003-2007 (no. 47) to the Kauffmann-White-Le Minor scheme. Res Microbiol 2010;161: 26-29.
- RUIZ FG, CONSTANTINO CF, QUINTANA LJA, CEDILLO PC Y URQUIZA BO. Patogenia de *Salmonella* Enteritidis FT13a y *Salmonella* Enteritidis biovar Issatschenko en pollo de engorda. Vet Méx 2008; 39:145-160.
- URQUIZA BO. Salmonelosis Aviar. Los avicultores y su entorno 2008; 65: 90-97.
- Tauxe RV, Tormey MP, Mascola I, Haargett-beam, Blake pa. Salmonellosis out-breaks on transatlantic flights: foodborne illness on aircraft 1974-1984. Am J. Epidemiol 1987; 125: 150-157.
- AVIÑA GLT. Evaluación de la inocuidad, posible respuesta antigénica y transmisión ovárica de *Salmonella* Enteritidis variedad 17 F-4 en gallinas de postura libres de patógenos específicos (tesis de licenciatura). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
- URQUIZABO. Patogenicidad e inocuidad de *Salmonella* Enteritidis var.17f-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con actividad enterotóxica (tesis de doctorado). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
- MORRISON TK. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. 3ra ed. México DF: Manual Moderno, 1998.
- DIARIO OFICIAL DE LA Federación Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993. Campaña nacional contra la Salmonelosis Aviar. DOF. 1 de Septiembre de 1994.
- MORILLA AG, BAUTISTA GCR. Manual de inmunología. México DF: DIANA, 1986: 295-308.

pre-enriquecimiento en las muestras obtuvieron una sensibilidad desde 79 a 100%, y una especificidad de 100% para los tres medios de enriquecimiento: agua peptonada amortiguada, medio Rappaport Vassiliadis y caldo tetrationato-Hajna.

Salmonella Issatschenko

En el presente estudio, las coincidencias de la PCR anidada comparada con los análisis bacteriológicos para SI fueron diferentes a SE. El pico de resultados positivos para SI en el caso de la PCR anidada fue a las 30 horas. Conforme fue pasando el tiempo PIE, los resultados positivos de la PCR anidada fueron disminuyendo hasta llegar a ninguna muestra positiva. En contraste, el trabajo realizado por Ruiz *et al.*,³ donde utilizaron SI, presentó aislamientos positivos a las 42, 150, 174 y 222 horas PIE, mientras que en las observaciones de lesiones histológicas, el pico fue desde las 30 horas PIE.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de la PCR y los estudios bacteriológicos de este trabajo fueron de 13 % y 43%, respectivamente, mientras que Schrank *et al.*⁴⁵ registraron sensibilidad de 47%. En estas dos pruebas se compararon diferentes medios de pre-enriquecimiento para *Salmonella* Typhimurium y SE.

Schrank *et al.*,⁴⁵ observaron que la sensibilidad fue más alta que la obtenida en el presente trabajo y concluyeron que tiene más eficacia el caldo tetrationato que el caldo selenito-cistina.

Se ha observado que con la prueba de PCR se obtienen resultados inconsistentes cuando se trabaja con el género *Salmonella*, por lo que Poppe *et al.*³⁵ sugirieron llevar a cabo otras pruebas como la microaglutinación, que otorga 81% de sensibilidad y 24% de especificidad.

Salmonella Enteritidis FT 13 A

En el presente estudio, al comparar la histopatología y la PCR anidada, la sensibilidad fue de 33% y la especificidad, de 0%, por lo que esta prueba fue más sensible que la bacteriología para determinar la presencia de *Salmonella* spp en los órganos a diferentes tiempos, pero menos específica. Ruiz *et al.*³ encontraron lesiones histológicas desde las 6 horas PIE en pollitos, sobre todo en la porción de íleon y ciegos, corroborando mediante microscopía electrónica la presencia de SE FT 13 A. Kinde *et al.*,⁴⁴ a partir de órganos de gallinas infectadas con SE FT 4, por vía oral e intravenosa, concluyeron que la aves inoculadas con una cepa de campo mostraron positividad de los tejidos por un corto periodo, y que *Salmonella* desapareció en la mayoría, ocho días después de la inoculación. Los aislamientos de SE fueron más frecuentes cuando las lesiones eran

11. SODIKOF CH. Pruebas diagnósticas y de laboratorio en pequeños animales: Una guía para el diagnóstico de laboratorio. 3ra ed. México DF: Harcourt, 2002.
12. THOMASON BM. Rapid detection of *Salmonella* microcolonies by fluorescent antibody. *Appl Microbiol* 1971; 22: 1064-1069.
13. DUFFEY PS, KANI JC, LEE JO, HILL WJ, KOKKA R. *Salmonella* serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3 (Kappa) monoclonal antibody (32-1-E3) reactive with a somatic factor 8- like polysaccharide antigen. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3050-3057.
14. PÉREZ MJA, VÁZQUEZ MJR, RODRÍGUEZ SMC, MIRANDA MRE, ROMO GAL, NADER GE. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. México DF, 1989.
15. PROPHET EB, MILLS B, ARRINGTON JB. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de Las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
16. CRUZ HFC, HENRY RM. Métodos diagnósticos en enfermedades infecciosas. En: Mas OJ, editor. Diagnóstico Molecular en Medicina. México D.F: Manual Moderno, 2004.
17. OLIVEIRA SD, SANTOS LR, SCHUCH DMT, SILVA AB, SALLE CTP, CANAL CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol* 2002; 87: 25-35.
18. WHYTE P, GILL K MC, COLLINS JD, GORMLEY E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol* 2002; 89: 53-60.
19. STONE GG, OBERST RD, HAYS MP, MCVEY S, CHENGAPPA MM. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1742-1749.
20. WAN J, KING K, CRAVEN H, MC AULEY C, TAN SE, COVENTRY MJ. Probelia trade mark PCR system for rapid detection *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. *Lett Appl Microbiol* 2000;30: 267-271.
21. GONZÁLEZ FT, ROJAS HRA. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México* 2005; 47: 388-390.
22. KONGMUANG U, LUK JMC, LINBERG AA. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B,C2 and D by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3072-3074.
23. WAY JS, JOSEPHSON KL, PILLAI SD, ABBASZADAGAN M, GESBA CP, PEPPER IL. Specific detection of *Salmonella* spp by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993; 39: 1473-1479.
24. ROSSEN LP, ORSKOV K, HOLMSTROM K, RASMUSSEN OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and ADN-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
25. WILDE J, EIDEN J, YOLKEN R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection

evidentes, además se demostró que el porcentaje de aves positivas al cultivo no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$).

En contraste con los resultados positivos del presente estudio por la PCR anidada, al relacionarlos con los hallazgos bacteriológicos e histopatológicos, se observó que es más sensible la histopatología, pero poco específica. En tanto que la bacteriología es menos sensible y más específica.

En el caso de SI y basado en el trabajo de Kinde *et al.*,⁴⁴ los hallazgos de Ruiz *et al.*,³ y lo obtenido en el presente estudio, muestran que las observaciones de las lesiones histológicas fueron más sensibles que los estudios bacteriológicos para detectar el daño del microorganismo en los tejidos, y gracias a la PCR anidada realizada en el presente trabajo, se detectó *Salmonella* en las primeras horas PIE, reflejado en mayor cantidad de muestras positivas que la bacteriología.

La técnica de la PCR anidada detectó *Salmonella*, pero sólo durante las primeras horas posinfección.

La relación entre los resultados de la PCR anidada, histopatología y bacteriología, presenta variaciones en función del tiempo posinoculación y la bacteria estudiada.

Se sugiere realizar el pre enriquecimiento de las muestras para obtener resultados con la PCR clásica.

of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1300-1307.

26. ALVA PJ. Determinación de la concentración mínima detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR de *Salmonella* Enteritidis en órganos y heces de aves infectadas experimentalmente (tesis de licenciatura). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
27. SALYERS AA, WHITT DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. 2ª ed. Washington DC: ASM Press 2002: 381-397.
28. FIDELMA BE, JIA L, OCHMAN H, SELANDER RK. Comparative genetics of the inv-spa invasion gene complex of *Salmonella* Enterica. *J Bacteriol* 1997; 6: 1985-1991.
29. ESPINAL MP, PRIETO SE, OTERO JV, MÁTTAR VS. Presencia del gen de invasividad invA en cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Rev Cubana Salud Pública* 2006; 32: 115-120.
30. RYCHLIK I, VAN KESTEREN I, CARDOVA L. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. *Lett Appl Microb* 1999; 29: 269-277.
31. SMITH RD. Veterinary clinical epidemiology. 3rd ed. Urbana, Illinois, USA: Taylor Francis, 2006:33-55.
32. MYINT MS, JOHNSON YJ, TABLANTE NL, HECKERT RA. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection

- of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol* 2006; 26: 599-604.
33. ASENSI GF, REIS EMF, DEL AGUILA EM, RODRIGUEZ D DOS P, SILVIA JT, PASCHOALIN VMF. Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* in Chicken rinse carcasses. *Bri Food J* 2009; 6:517-527.
 34. SOUMET C, ERMEL G, SALVAT G, COLIN P. Detection of *Salmonella* spp in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. *Lett App Microbiol* 1997; 24: 113-116.
 35. POPPE C, JOHNSON PR, FOSBERG MC, IRWIN JR. *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Can J Vet Res* 1992; 56: 226-232.
 36. CHIU T, CHEN T, HWANG W, TSEN H. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp in food. *Inter J Food Microbiol* 2005; 97: 259-265.
 37. DENG S, CHENG A, WANG M, CAO P. Gastrointestinal tract distribution of *Salmonella* Enteritidis in orally infected mice with a species-specific fluorescent quantitative polymerase chain reaction. *World J Gastro* 2007; 13: 6568-6574.
 38. TURNBULL PCB, SNOEYENBOS GH. Experimental salmonellosis in the chicken. I Fate and host response in alimentary canal, liver and spleen. *Avian Dis* 1974; 18: 153-177.
 39. POPPE C, MCFADDENKA, BROUWERAM, DEMCZUK W. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains. *Can J Vet Res* 1993; 57: 176-184.
 40. MONTENEGRO MA, MORELLI G, HELMUTH R. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolations of defined sources. *Microb Pathog* 1991; 11: 391-397.
 41. GULIC PA. Mini-review. Virulence plasmids of *Salmonella* Typhimurium and other *Salmonella*. *Microb Pathog* 1990; 8:3-11.
 42. POPPE C, CURTISS R III, GULIC PA, GYLES CL. Hybridization studies with a ADN probe derived from the virulence region of the 60 MDa plasmid of *Salmonella* Typhimurium. *Can J Vet Res* 1989; 53: 378-384.
 43. PÉREZ CM, SÁNCHEZ MM, HENAO S, CARDONA-CASTRO NM. Estandarización y evaluación de dos pruebas de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella* enterica subespecie enterica en huevos. *Arch Med Vet* 2008; 40: 235-242.
 44. KINDE H, SHIVASPRASAD HL, DAFT BM, READ DH, ARDANS A et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. *Avian Dis* 2000; 44:239-248.
 45. SCHRANK IS, MORES MAZ, COSTA JLA, FRAZZON APG, SONCINI R, SCHRANK A *et. al.* Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet Microbiol* 2001; 82:45-35.