

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología

Informe Escrito Final

**Optimización de la técnica de PCR Punto Final y Tiempo Real para la
detección de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Gallinarum en
aislamientos bacterianos y tejidos biológicos obtenidos a partir de aves de
corral**

**Pasantía presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biotecnología**

B.Sc. Makayla Tatiana Leza Leza

Campus Omar Dengo
Heredia, 2020

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

CAROLINA ALEXANDRA MARIN VINDAS (FIRMA)	Firmado digitalmente por CAROLINA ALEXANDRA MARIN VINDAS (FIRMA) Fecha: 2021.02.09 13:55:06 -06'00'
---	---

Licda. Carolina Marín Vindas

Representante, Decano, quién preside



M.Sc. Silvia Mau Inchaustegui

Representante, Unidad Académica

EUNICE FRANCINIE VIQUEZ RUIZ (FIRMA)	Firmado digitalmente por EUNICE FRANCINIE VIQUEZ RUIZ (FIRMA) Fecha: 2021.02.08 15:52:21 -06'00'
---	--

M.Sc. Eunice Viquez Ruiz

Tutora

RODOLFO UMAÑA CASTRO (FIRMA)	Firmado digitalmente por RODOLFO UMAÑA CASTRO (FIRMA) Fecha: 2021.02.08 12:28:06 -06'00'
---------------------------------------	---

M.Sc. Rodolfo Umaña Castro

Asesor

JORENGETH ABAD RODRIGUEZ RODRIGUEZ (FIRMA)	Firmado digitalmente por JORENGETH ABAD RODRIGUEZ RODRIGUEZ (FIRMA) Fecha: 2021.02.08 11:59:46 -06'00'
--	--

MPM. Abad Rodríguez Rodríguez

Invitado especial

Resumen

Las especies del género *Salmonella* son importantes patógenos zoonóticos que ocasionan grandes pérdidas económicas y problemas sanitarios en todo el mundo. Dentro de estas se encuentra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Gallinarum biotipo Gallinarum y biotipo Pullorum. Las enfermedades causadas por este serotipo son responsables de una elevada mortalidad en aves de corral generando daños económicos para los avicultores. Además, es de importancia epidemiológica y de reporte obligatorio por los servicios nacionales de salud veterinaria. En el presente estudio se llevó a cabo la estandarización de la PCR Punto Final y Tiempo Real (qPCR) para la detección de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum en muestras de cultivo bacteriano y de tejidos biológicos provenientes de aves de corral con sintomatología sospechosa y previamente confirmadas como positivas. Para la PCR Punto Final se obtuvo una repetibilidad, especificidad y sensibilidad del 100%, y un valor Kappa de 0.98 para la reproducibilidad. Mientras que, para la PCR Tiempo Real se obtuvo una eficiencia del 103% y valores del coeficiente de variación menores al 6% para la repetibilidad y reproducibilidad. El límite de detección de ADN genómico fue de 6.4 pg/ μ L y el del número de células viables de 3×10^2 UFC/mL para la PCR Punto Final y de 10 copias de ADN por reacción para la qPCR. Mediante la secuenciación y análisis de los productos de PCR, el árbol filogenético obtenido posicionó a las cepas estudiadas junto con las del serotipo *S. Gallinarum*, corroborando su identidad. Además, se demostró la aplicabilidad de la técnica mediante la amplificación de muestras de tejido biológico. Por lo tanto, se logra optimizar una técnica molecular que permite una detección rápida, confiable y sensible de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum, lo cual reducirá el tiempo de espera para tomar acción en casos de sospecha clínica y posibles brotes.

Agradecimiento

En primera instancia, a mi tutora Máster Eunice Víquez Ruiz por su constante apoyo, confianza y dedicación durante el desarrollo de mi tesis.

A mis asesores Máster Rodolfo Umaña Castro y a el Dr. Elías Barquero Calvo por las recomendaciones, guía, confianza y el constante aporte de sus conocimientos para la conclusión exitosa de este trabajo.

A el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) por haberme brindado la oportunidad de trabajar en sus instalaciones y al personal del Laboratorio de Bacteriología por su completa disponibilidad y compromiso durante todo el proceso.

A Máster Carolina Sancho Blanco por sus recomendaciones y soporte técnico en las secuenciaciones Sanger de las cepas bacterianas de este estudio al igual que, al Dr. Frank Solano Campos por su colaboración con los análisis de PCR tiempo real.

A el Personal de la Escuela de Ciencia Biológicas que de manera directa o indirecta han formado parte de este proceso y han contribuido en mi formación profesional.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional por el fondo económico brindado a través del Fondo para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles en Investigación (FOCAES).

Dedicatoria

A mis padres, hermanos y mi novio por darme su apoyo, motivación y por siempre creer en mí. La conclusión exitosa de este proyecto y de mi carrera profesional ha sido gracias a ellos.

Índice

Miembros del tribunal	I
Resumen.....	II
Agradecimiento.....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras.....	VIII
Abreviaturas o acrónimos	IX
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	5
1.3. Planteamiento del problema.....	6
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos	7
2. Marco teórico.....	7
2.1. Generalidades de <i>Salmonella</i> y la Salmonelosis.....	7
2.1.1 Estructura antigénica.....	8
2.1.2 Patogenicidad y síntomas de la tifosis aviar y la pulorosis.....	9
2.1.3 Tratamiento	10
2.1.4 Técnicas de diagnóstico	11
2.1.5 Control y prevención de la Salmonelosis.....	13
2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
2.2.1 Optimización de la PCR y secuenciación de ADN.....	16
3. Marco Metodológico.....	18
3.1. Cultivo bacteriano.....	18

3.2. Extracción de ADN bacteriano	18
3.3. Cuantificación del ADN extraído	19
3.4. Optimización de la PCR Punto Final y la qPCR.....	19
3.4.1. Secuenciación del producto de PCR y análisis bioinformático	22
3.4.2. Estudio de especificidad y sensibilidad diagnóstica de la PCR	23
3.4.3. Estudio del límite de detección (sensibilidad analítica).....	23
3.4.4. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad	24
3.4.5 Análisis estadístico.....	25
3.4.6 Detección de <i>S. Gallinarum/Pullorum</i> en tejidos biológicos	26
4. Resultados y discusión.....	27
4.1 Optimización de la PCR Punto Final y la qPCR.....	27
4.2 Análisis bioinformático de la secuenciación.....	30
4.3 Estudio de especificidad y sensibilidad diagnóstica de la PCR	31
4.4 Límite de detección (sensibilidad analítica)	31
4.5. Análisis de reproducibilidad y repetibilidad	33
4.6 Detección de <i>S. Gallinarum/Pullorum</i> en tejidos biológicos	35
5. Conclusiones	36
6. Recomendaciones	37
7. Referencias.....	39
8. Anexos	50

Índice de cuadros

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores <i>flhB</i> (Forward y Reverse)	20
Cuadro 2. Volúmenes y concentración para la mezcla de reacción de ambas técnicas de PCR .	20
Cuadro 3. Tabla de contingencia 2X2	25
Cuadro 4. Interpretación de los valores de Kappa.....	26
Cuadro 5. Resultados de la tabla de contingencia 2X2	34
Cuadro 6. Ensayo intra-laboratorio de la qPCR	34
Cuadro 7. Ensayo inter-laboratorio de la qPCR	35

Índice de figuras

Figura 1. Electroforesis capilar para la determinación de la temperatura de hibridación empleando la cepa de <i>S. Gallinarum</i> (Vacunal SG 9R).....	28
Figura 2. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas del ADN de la cepa vacunal SG 9R	29
Figura 3. Árbol filogenético basado en el método de máxima verosimilitud (ML) de los fragmentos del gen <i>flhB</i>	30
Figura 4. Electroforesis capilar para la determinación de la especificidad y sensibilidad..	31
Figura 5. Electroforesis capilar para la determinación del límite de detección de células bacterianas viables y ADN genómico.....	32
Figura 6. Curva de amplificación para el límite de detección mediante qPCR.....	33
Figura 7. Electroforesis capilar de las muestras de tejido biológico.	36

Abreviaturas o acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ct	Ciclo umbral del inglés Cycle Threshold
DS	Desviación Estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
TBE	Tris-Borato-EDTA
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
% CV	Porcentaje del Coeficiente de Variación

1. Introducción

Las especies pertenecientes al género *Salmonella* se caracterizan por ser Gram negativas, anaerobias facultativas y flageladas. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y son un grupo muy complejo, presentando 6 subespecies con más de 2,579 serovariedades, dentro de las cuales se puede encontrar a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Gallinarum. Este último serotipo presenta dos biotipos; Gallinarum (*S. Gallinarum*) y Pullorum (*S. Pullorum*), y a excepción del resto, no presenta motilidad debido a la ausencia de flagelos (Dalai et al. 2015). Estos biotipos son responsables de producir la enfermedad sistémica conocida como tifosis aviar en el caso de *S. Gallinarum* y pulorosis al tratarse de *S. Pullorum*, las cuales son exclusivas en aves, especialmente en gallinas de corral. Esto se debe a que dichos patógenos se encuentran muy adaptados a su hospedador, restringiéndose su transmisión a los seres humanos u otros animales (Foley et al., 2013). Ambas enfermedades causan, en la mayoría de los casos, una elevada mortalidad en las gallinas que se encuentran tanto en periodo de crecimiento como en adultos y genera por lo tanto grandes pérdidas económicas en la avicultura de diversos países (Barrow y Freitas-Neto, 2011). La detección del patógeno se realiza principalmente mediante técnicas microbiológicas, sin embargo, en la última década se han realizado esfuerzos en cuanto a la búsqueda de técnicas más rápidas e igual de confiables, como lo es la PCR Punto Final y la PCR Tiempo Real (qPCR) (Xiong et al., 2016). Dichas técnicas han tenido gran éxito en la identificación de esta y muchas otras bacterias, logrando reducir en gran medida el tiempo para la obtención de resultados. Debido a que las pruebas microbiológicas para la detección de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum son laboriosas y pueden tardar incluso semanas en concluirse, el objetivo del presente trabajo es evaluar la técnica de PCR para la detección de dicho serotipo en aislamientos bacterianos y tejidos biológicos obtenidos de aves de corral con el fin de mejorar el diagnóstico de la enfermedad generada por dicha bacteria en Costa Rica.

1.1. Antecedentes

En muchos países de Asia y Suramérica la tifosis aviar y la pulorosis aún se consideran enfermedades endémicas. En la India, estudios realizados por Arora et al. (2015) reportaron una

mortalidad de aves de corral con dichas enfermedades del 71.55% en el transcurso de 3 años. De igual manera, en Etiopía al oriente de África, Tadele et al. (2014) reportaron 31.9% de prevalencia tanto en aves exóticas como domésticas. Por otro lado, Celis-Estupiñan et al. (2017) también reportaron brotes de las enfermedades en diferentes regiones de Brasil. Debido a esto en dichos países actualmente se encuentra en ejecución la implementación de programas de vacunación y de control general de las enfermedades.

Existen ciertos factores que juegan un papel importante en la transmisión y persistencia de las enfermedades mencionadas, siendo uno de estos la edad del hospedero. Los autores Rahman et al. (2004), lograron identificar una prevalencia por *Salmonella Pullorum* de 53.25% en gallinas adultas, un 14.16% en las que se encontraban incubando sus huevos, un 16.10% en la que estaban en etapa de desarrollo y un 16.10% en las gallinas menores a 1 año, demostrando la existencia de una relación entre la edad y la capacidad de supervivencia ante la enfermedad. Otro factor para tomar en cuenta es la raza del individuo; en relación con esto, Bumsteada y Barrowa (1993), lograron demostrar la importancia de realizar una selección de razas para disminuir los brotes de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Los autores infectaron a 367 gallinas comúnmente empleadas para la venta de huevos con ambos biotipos y realizaron observaciones durante 3 semanas luego de la inoculación, logrando evidenciar una disminución en la sensibilidad a la enfermedad en las diferentes variedades de gallinas.

Por otro lado, para el estudio, identificación, confirmación y seguimiento de esta enfermedad es necesario el diagnóstico de la misma por diferentes metodologías. Se ha reportado la eficiencia de una gran cantidad de técnicas para la detección de *S. Gallinarum/Pullorum*. Las más empleadas son las técnicas serológicas, las microbiológicas y las bioquímicas (Rubio et al., 2017). Sin embargo, en la última década se ha evidenciado que la mayoría de los laboratorios prefieren emplear técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de diferentes microorganismos (Navarro et al., 2015). Dicha técnica se ha logrado optimizar para la detección de patógenos específicos, lo cual facilita la obtención de resultados rápidos y exactos. Según Bustin (2017) es posible disminuir el tiempo para obtener resultados por qPCR realizando modificaciones en la concentración de los reactivos y en la temperatura durante las diferentes etapas de la amplificación sin afectar la especificidad y sensibilidad de la prueba. Dentro de sus recomendaciones están el uso de amplicones de 100 pb, incrementar la cantidad de

Guanina-Citosina a un 60 % en los cebadores y emplear una temperatura de extensión superior a 65 °C.

De manera similar, Xiong et al. (2016) emplearon la técnica de PCR Punto Final para la identificación de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum proveniente de muestras de gallinas en una granja en Jiangu, China. Dicho autor utilizó el cebador *flhB*, correspondiente a una proteína de membrana altamente conservada en el sistema de secreción flagelar de bacterias, con el cual obtuvo productos de 182 pb para *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, el proceso tardó tan solo 3 horas en concluirse. Mientras que, una prueba microbiológica tradicional puede tardar un mínimo de 4 a 6 días (Gwida y Al-Ashmawy, 2014). Sin embargo, con dicho cebador no se logró diferenciar entre ambos biotipos. En relación con esto, existen estudios recientes enfocados en la distinción entre biotipos, tal es el caso de las amplificaciones realizadas por Xiong et al. (2018) empleando cebadores dirigidos a regiones variables de un gen presente en los serotipos de *S. enterica* (el gen *ratA*) y un gen presente únicamente en ambos biotipos de *S. Gallinarum* (el gen *I137_08605*) los cuales fueron obtenidos al comparar el genoma completo de estos. Con dichos cebadores se lograron obtener secuencias de 290 pb y 571 pb para *S. Gallinarum* y de 290 pb para *S. Pullorum*.

Por otro lado, en lo que respecta al tratamiento de la enfermedad, debido a la generación de resistencia a antibióticos por parte de este patógeno, se ha recomendado sustituir dichos fármacos por vacunas, ya sean vivas o inactivadas (Barrow y Freitas-Neto, 2011). En relación con esto, Łaniewski et al. (2014) demostraron la eficiencia de las vacunas vivas para la protección de gallinas de la raza Leghorn contra *S. Gallinarum*. En dicho estudio, se eliminó el gen *fur* del patógeno, encargado de regular la captación férrica y con una dosis administrada de manera intramuscular, se logró un 100% de supervivencia en las gallinas inyectadas con la vacuna viva atenuada, mientras que solo un 38% de las que no fueron vacunadas lograron sobrevivir a la enfermedad. Por lo tanto, se demostró la capacidad de protección que presentan las vacunas, así como la importancia de una adecuada administración de las mismas. A pesar del éxito que se ha obtenido en la formulación de nuevas vacunas contra dicho patógeno, en la mayoría de los países aún se emplea la vacuna viva SG 9R, desarrollada en 1950, que ha demostrado resultados persistentes y positivos luego de más de 60 años de uso en aves de corral (Wigley, 2017).

Respecto al uso de vacunas y diferentes medidas de prevención, la aplicación de programas de vigilancia y control de enfermedades tanto en humanos como en animales han demostrado un gran éxito en varios países. Tal es el ejemplo de Estados Unidos, donde se implementó el Plan Nacional de Mejora Avícola (NPIP, por sus siglas en inglés) dirigido principalmente a la erradicación de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en gallinas. Con este programa, en el año 1960 se logró la eliminación de las enfermedades causadas por estos patógenos (Andino y Hanning, 2015). Para esto se implementaron prácticas rigurosas de bioseguridad y monitoreo constante de aves en granjas que se dedicaban a la comercialización de huevos y carne de pollo. Además, con el fin de complementar el plan anterior, se inició un programa de vacunación en el año 1956. La vacuna fue creada empleando la cepa viva 9R de *S. Gallinarum*, la cual contiene una estructura de lipopolisacáridos semi-rugosa modificada y por lo tanto logra reducir la virulencia del patógeno (Wigley, 2017). Cabe mencionar que, el programa NPIP también se ha enfocado en la erradicación de otras enfermedades relacionadas con aves tales como *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma gallisepticum* (Derksen et al., 2018).

En el caso de Costa Rica, según los últimos reportes de la OIE (Organización Mundial de Salud Animal) la prevalencia de la enfermedad en el país aún es latente. Es por esto que, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) implementó en el 2009 el Programa Nacional de Salud Aviar para *Salmonella*, y a raíz de dicho programa generó en el 2013 el Plan de control de Salmonelosis aviar en granjas de postura comercial en los distritos de Turrúcares y Piedras Negras (SENASA, 2013b). Este programa se formuló debido a brotes reportados en varias granjas de Turrucare, Alajuela y Piedras Negras, San José. Dentro de las actividades de control de este plan se encuentran: la definición del Área Afectada y el Área de Control, la inspección, el diagnóstico y la atención a denuncias, los rastreos, cuarentena, medidas de bioseguridad y en caso necesario, el sacrificio de las aves. Cabe mencionar que, en Costa Rica sólo se han aprobado vacunas vivas o inactivadas de *S. Enteritidis* para tratar dicha enfermedad, debido a su capacidad de generar protección cruzada, sin embargo, el SENASA no autoriza el uso de vacunas vivas derivadas de *S. Gallinarum* en aves reproductoras por la posibilidad que esta presenta de revertirse a un estado de virulencia (SENASA, 2013a).

1.2. Justificación

La tífosis aviar y la pulorosis tiene como consecuencia una elevada tasa de mortalidad en aves de corral, ocasionando grandes pérdidas económicas para los avicultores a nivel mundial. Con excepción de Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y varios países de Europa del Este (Shivaprasad y Barrow, 2008), en varios países de América Latina, África y Asia aún no se ha logrado su erradicación, por lo que aún se considera un problema persistente. No obstante, debido a que dichas enfermedades no presentan gran relevancia para la salud pública humana, los esfuerzos para generar protocolos de control y mejorar técnicas para su diagnóstico han sido escasos (Terzolo, 2012).

Actualmente, las técnicas más utilizadas para diagnosticar dichas enfermedades se basan en cultivos tradicionales de la bacteria en medios selectivos, caracterizaciones bioquímicas convencionales o pruebas serológicas (Rubio et. al, 2017). A pesar de que dichas técnicas son muy confiables, también son muy laboriosas e incluso puede requerir de varios días para obtener un resultado. Lo anterior no solo incrementa las pérdidas económicas de los productores, sino que prolonga el tiempo para la toma de decisiones lo cual podría ocasionar la propagación de la enfermedad a otras granjas. Debido a esto, en algunos países se ha intentado emplear técnicas más eficientes como la PCR Punto Final y qPCR (Terzolo, 2011). Estas últimas permiten diferenciar al patógeno a nivel de biotipo, lo cual es imposible de lograr con técnicas de cultivo o la serotipificación debido a la gran similitud entre ambos (Batista et. al, 2013). Lo anterior permite tomar decisiones adecuadas para el mejor manejo de cada enfermedad.

Por otro lado, en Costa Rica la avicultura juega un papel muy importante en la economía del país al contribuir con un 13.5% en la producción pecuaria y, por lo tanto, generar miles de empleos a nivel nacional, esto, según el informe de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (2018). Debido a la importancia que presenta dicho sector en el desarrollo del país, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) cuenta con un programa para la generación de protocolos, vigilancia, diagnóstico y tratamiento de enfermedades causadas por *Salmonella* spp.. Sin embargo, no existe una norma que exija el uso de vacunas preventivas en las granjas; y la detección de la bacteria aún se realiza por medio de técnicas microbiológicas,

inmunológicas o bioquímicas (SENASA, 2013a), las cuales tienen sus limitaciones en tiempos de obtención de resultados, eficiencia, sensibilidad y especificidad. Cabe mencionar que, mediante el Decreto Ejecutivo No. 34669-MAG (2008) se establece como enfermedad de declaración obligatoria en Costa Rica a *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

En ese contexto, con el presente trabajo se pretende fortalecer el diagnóstico de la enfermedad mediante la optimización de técnicas moleculares rápidas y confiables, tales como la PCR Punto Final y la qPCR, empleando para esto cepas bacterianas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* aisladas de aves de corral y cepas bacterianas de control, además de tejidos infectados de aves sospechosas. Lo anterior aportaría una herramienta útil al Programa Nacional de Salud Aviar del SENASA, para la pronta identificación del patógeno lo que permitiría disminuir el tiempo de espera para tomar acción en casos de sospecha clínica y posibles brotes.

1.3. Planteamiento del problema

Los brotes recurrentes de tifosis aviar y pulorosis causan pérdidas económicas a los avicultores del país y los métodos empleados actualmente para la detección de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum, bacterias causantes de dichas enfermedades, son laboriosos y pueden tardar incluso semanas en concluirse, alargando el tiempo para la toma de decisiones. Debido a lo anterior se genera la siguiente pregunta; ¿Qué tan eficiente es la técnica de PCR para detectar *S. Gallinarum*/Pullorum en muestras de aislamientos bacterianos y tejidos biológicos obtenidos de aves de corral?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la técnica de PCR para la detección del serotipo *Salmonella* Gallinarum en aislamientos bacterianos y tejidos biológicos obtenidos de aves de corral con el fin de mejorar el diagnóstico de las enfermedades generadas por dicho serotipo en Costa Rica.

1.4.2. Objetivos específicos

- Optimizar la técnica de PCR Punto Final y Tiempo Real para la detección de *S. Gallinarum* en aislamientos bacterianos obtenidos de órganos de aves de corral.
- Identificar el serotipo *S. Gallinarum* a través de la secuenciación de amplificaciones positivas obtenidas mediante PCR.
- Evaluar la aplicabilidad de ambas técnicas de PCR optimizadas para la detección de *S. Gallinarum* en muestras de tejidos biológicos de aves de corral.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades de *Salmonella* y la Salmonelosis

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son anaerobias facultativas, con forma de bacilo y Gram negativas. Además, poseen una longitud de 2 a 5 micrómetros y un ancho de 0.5 a 1.5 micrómetros, presentándose en la mayoría flagelos peritricos (Andino y Hanning, 2015). En términos generales, las especies y subespecies de bacterias se dividen en serotipos y biotipos, basándose el primero en los antígenos presentes en la pared celular y el segundo en diferencias fisiológicas o bioquímicas entre microorganismos (Parker et al., 2019).

En cuanto a la clasificación del género *Salmonella*, el esquema de Kauffman-White, propuesto en 1964, lo divide en dos especies; *S. enterica* y *S. bongori*. La primera, se divide a su vez en 6 subespecies que se clasifican en números romanos y un nombre, mientras que la segunda especie está compuesta por 20 serotipos (Ryan et al., 2017). Dicho esquema o clasificación se basa en los antígenos de la pared celular bacteriana y permite la identificación a nivel de especie, subespecie y serotipo. Ambas especies son capaces de causar salmonelosis, entendiéndose esto

según la definición por Freitas et al. (2010), como cualquier infección sintomática causada por bacterias pertenecientes al género *Salmonella* y que en su mayoría está asociada con la ingesta de alimentos de origen animal contaminados con el patógeno. Dicha infección no se restringe a alimentos, si no también se puede adquirir a través del contacto directo o indirecto con animales portadores.

La especie *S. enterica* subsp. *enterica* alberga el mayor porcentaje de serotipos (59%) del género *Salmonella* y es responsable del 99% de las infecciones reportadas en humanos y animales de sangre caliente. Las demás subespecies de *S. enterica* son: *salamae*, *enterica*, *arizonae*, *houtenae* e *indica* y se han aislado principalmente del medio ambiente, animales de sangre fría y en pocas ocasiones de seres humanos (Ryan et al., 2017). Según Coburn et al. (2007) *S. enterica* es la responsable de tres padecimientos principales: fiebre entérica conocida como tifoidea, enterocolitis o diarrea y bacteriemia. Por otro lado, cada serotipo interactúa con su huésped de manera específica, generando en cada uno una reacción diferente ante la infección. Tal es el caso de los serotipos Typhimurium y Choleraesuis los cuales a pesar de que son capaces de infectar tanto a humanos como a animales, en cada uno de estos hospederos la enfermedad se manifiesta con diferentes síntomas. De igual manera, existen serotipos muy adaptados a su hospedero como *Salmonella* Typhi, que se restringe únicamente a humanos ocasionando la enfermedad conocida como fiebre tifoidea y *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en aves, siendo estos últimos responsables de la tifosis aviar y la pulorosis respectivamente (Andino y Hanning, 2015).

2.1.1 Estructura antigénica

La estructura antigénica de *Salmonella* spp. es semejante a la de otras bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta se encuentra conformada principalmente por el antígeno somático “O” y el flagelar “H”. El primero es un lipopolisacárido presente en la pared celular del patógeno y se dividen en dos clases: los mayores y los menores, siendo la clase mayor la que permite realizar distinciones entre diferentes serotipos (Parra et al., 2002). El serotipo *S. Gallinarum* presenta la fórmula antigénica 1,9,12 y por lo tanto es clasificada dentro del grupo D, mientras que la fórmula de *S. Thyphimurium* es 4,12 y pertenece al grupo B (Arora, et al., 2015).

Por otro lado, el antígeno Flagelar “H” es proteico y se encuentra conformado por flagelina. Se divide en dos fases, la fase 1 (H1) y la fase 2 (H2), las cuales corresponden a diferentes estados

de motilidad y permiten diferenciar entre especies. Las especies que presentan únicamente la primera fase (H1) se consideran monofásicas mientras que las que poseen ambas fases (H1 y H2) se conocen como difásicas (Parra et al., 2002). A pesar de que *Salmonella* spp. presenta motilidad e incluso es capaz de alternar entre fases ante algún estímulo ambiental existen excepciones como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Estas últimas presentan los genes estructurales para la codificación de flagelina, sin embargo, no son capaces de formar los flagelos (Xiong et al., 2016).

2.1.2 Patogenicidad y síntomas de la tifosis aviar y la pulorosis.

La transmisión y patogenicidad de las diferentes enfermedades ocasionadas por *Salmonella* spp. siguen un patrón muy similar entre serotipos, incluyendo a *S. Gallinarum*. La infección inicial se da por la ingesta de alimentos contaminados o por el contacto directo o indirecto con animales portadores de la enfermedad. También es posible la transmisión por la presencia del patógeno en el ambiente. El nicho preferido del patógeno es el intestino del hospedero y es por tal motivo que, la colonización inicial se da en el tracto gastrointestinal y al ser esta una infección septicémica, logra distribuirse fácilmente por el sistema linfático y la sangre al resto del cuerpo (Huberman y Terzolo, 2014).

En primera instancia, se da la penetración de la bacteria en la célula huésped, dicha célula puede ser un macrófago o una célula dendrítica, posterior a esto, una vez dentro de la célula se da la proliferación de la bacteria y en muchos casos, la colonización de otros órganos como los pulmones, hígado, bazo e incluso el sistema reproductivo. Según Foley et al. (2013) la capacidad de supervivencia y proliferación de *Salmonella* spp. dentro de un organismo específico como las aves está en directa relación con el entorno o ambiente que proporciona el huésped, como su pH y la temperatura del medio, incluyendo también el sistema inmune de este, los organismos comensales que podrían actuar como defensa ante la infección y la genética del patógeno.

En el caso de la tifosis aviar y la pulorosis, como se mencionó anteriormente es causada por *S. enterica* serotipo Gallinarum biotipo Gallinarum y biotipo Pullorum, respectivamente. Estas se clasifican en el esquema de Kauffman-White como perteneciente al serogrupo D, junto con *Salmonella* Enteritidis (OIE Terrestrial Manual, 2018b). Entre los síntomas más observados se encuentran; la pérdida de apetito y peso, la deshidratación, la debilidad, la diarrea y a nivel sistémico la congestión e inflamación del hígado, riñones y bazo. La mortalidad puede ser de hasta

un 100% y por lo general ocurre dentro de 4 a 10 días luego de la exposición inicial (Shivaprasad y Barrow, 2008).

Ambas enfermedades pueden ser transmitidas de manera horizontal a otras aves o vertical a la prole. La mayor incidencia se da en aves de corral, especialmente en gallinas adultas. Aunque los casos clínicos en aves silvestres no son recurrentes, existen reportes de la enfermedad en especies acuáticas, incluidas varias aves marinas (Shivaprasad y Barrow, 2008). A pesar de la gran semejanza entre los biotipos de *S. Gallinarum*, los síntomas generados por cada uno son diferentes. En el caso de *S. Pullorum* la infección ocurre principalmente en aves jóvenes y la mortalidad es menor que la causada por el *S. Gallinarum* (Barrow y Freitas-Neto, 2011).

2.1.3 Tratamiento

Los tratamientos más comúnmente empleados para las enfermedades aviares son los antibióticos y de manera preventiva, las vacunas. Los primeros presentan la ventaja de ser de fácil acceso al público, ya que, suelen encontrarse en veterinarias o farmacias, tienen un menor costo y son más fáciles de administrar que las vacunas. Sin embargo, uno de los mayores retos que presenta este tipo de tratamiento es el incremento de la resistencia bacteriana ante los antimicrobianos. Este fenómeno se debe a un proceso de selección en el cual las bacterias que son sensibles al antibiótico son eliminadas mientras que las que presentan algún nivel de resistencia o lo adquieren a través de mutaciones, persisten y proliferan dentro del organismo (Zaman et al., 2017).

Entre los antibióticos más utilizados para el tratamiento de la tifosis aviar y la pulorosis se encuentran la neomicina, gentamicina, cloranfenicol y la ampicilina. No obstante, debido a la resistencia antimicrobiana, existe la posibilidad de que los organismos infectados que hayan sido tratados con antibióticos y logren sobrevivir se conviertan en portadores asintomáticos de la enfermedad y, por lo tanto, sean capaces de contagiar a otros. Debido a lo anterior, la mayoría de los países recurren a la prevención y erradicación del patógeno y no al tratamiento de este (Shivaprasad, 2000).

Por otro lado, las vacunas se emplean como un método de prevención ante las enfermedades aviares mencionadas. Actualmente se utilizan para dicho fin las vacunas vivas atenuadas (Lee et al., 2005). Estas son elaboradas con el patógeno completo, junto con sus factores

patogénicos y, por lo tanto, son capaces de efectuar una infección real creando una respuesta inmune más fuerte y eliminando así la necesidad de aplicar una segunda dosis para que continúen siendo efectivas en el organismo. Presentan ciertas ventajas como un bajo costo y fácil producción, protección a largo plazo y la estimulación del sistema inmune innato (Tahamtan, 2017).

Para prevenir la tifosis aviar en la mayoría de los países se utiliza la vacuna viva atenuada de la cepa 9 de *S. Gallinarum* (SG 9R). Esta es administrada mediante una inyección subcutánea en aves sanas a partir de las 4 semanas de edad y es capaz de reducir la mortalidad entre 0% a 5%. Mientras que, la duración de la inmunidad va desde 21 días hasta aproximadamente 61 días de edad y depende del fabricante de la vacuna y la susceptibilidad de las aves (Lee et al., 2005).

2.1.4 Técnicas de diagnóstico

Existe una amplia variedad de técnicas de diagnóstico, entre ellas los métodos microbiológicos como los medios de cultivos artificiales, así como bioquímicos, serológicos y moleculares como la PCR. En el caso de los medios de cultivo, estos permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos al proporcionar los nutrientes y ambiente necesario para que se lleve a cabo la proliferación de estos, además tienen un costo relativamente bajo. Sin embargo, cabe mencionar que la identificación del patógeno en este caso requiere de personal altamente capacitado en el área. Es común que en la mayoría de los laboratorios las técnicas microbiológicas se consideren como las de referencia o estándar para la confirmación de la enfermedad (Váradí et al., 2017).

Los medios de cultivo también permiten llevar a cabo análisis de virulencia, del potencial invasivo del microorganismo, así como estudios de resistencia a antibióticos. Se suelen dividir en diferenciales y selectivos, ambos basándose en las necesidades metabólicas de los microorganismos para promover o inhibir su crecimiento (Olmos et al., 2010). Sin embargo, estos no poseen la capacidad de discernir entre biotipos, como los pertenecientes a los diferentes serotipos de *Salmonella* spp. (OIE Terrestrial Manual, 2018b). Los que más se emplean para la detección de este patógeno son el agar MacConkey, Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Verde Brillante y el agar Bismuto Sulfito (Piñeros y Rodríguez, 2010).

El agar MacConkey permite la identificación de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de lactosa e inhibe el crecimiento de bacterias no entéricas (Olmos et al., 2010). Al emplear este medio para la identificación de *Salmonella* spp., se observan colonias incoloras ya que estas no son capaces de fermentar lactosa (Piñeros y Rodríguez, 2010). El agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) se utiliza para el crecimiento de bacterias entéricas Gram negativas y por lo tanto es ideal para el aislamiento de *Salmonella* spp. Este, además, permite diferenciar a las colonias del serotipo *S. Gallinarum* ya que estas se observan translucidas u opacas y sin un punto negro en el centro (OIE Terrestrial Manual, 2018b). En cuanto al agar Verde Brillante, este inhibe el crecimiento de coliformes y ciertas cepas de *Proteus*. Las colonias de *Salmonella* spp. obtenidas con este medio son translucidas o rojo pálido y de 1 a 3mm en diámetro. Por último, el agar Bismuto Sulfito inhibe el crecimiento de organismos comensales y se utiliza principalmente para el aislamiento de *Salmonella* Typhi, obteniendo colonias de color gris, café o negro que pueden llegar a presentar un brillo metálico (Piñeros y Rodríguez, 2010).

Por otro lado, las pruebas bioquímicas se basan en la caracterización metabólica de las bacterias mediante reacciones enzimáticas en medios cromogénicos (Olmos et al., 2010). Esta técnica de diagnóstico suele ser muy específica y permite, en el caso de *Salmonella* spp., la distinción de *S. Gallinarum* a nivel de biotipo. Esto se debe a que el biotipo *S. Pullorum* no fermenta dulcitol, pero es capaz de descarboxilar ornitina, lo contrario ocurre para el biotipo *S. Gallinarum* (Shivaprasad y Barrow, 2008). Las pruebas más comunes para la identificación de *Salmonella* spp. son la de Indol, la de oxidasa, la de catalasa y la de movilidad (Piñeros y Rodríguez, 2010).

En relación con lo anterior, se han fabricado equipos automatizados como el Vitek 2 (bioMérieux), que en unas pocas horas permiten la identificación del microorganismo aislado basándose en reacciones químicas. Este equipo tiene como principio básico realizar una lectura del inóculo o muestra mediante el uso de un fluorímetro y un fotómetro los cuales registran turbidez, fluorescencia y varias señales colorimétricas generadas por reacciones bioquímicas o por el crecimiento de la bacteria. Esto permite realizar una identificación del microorganismo al igual que llevar a cabo pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Váradi et al., 2017).

Las pruebas serológicas por su parte se basan en la reacción entre un antígeno específico con un anticuerpo y se dividen en 2 categorías; las directas y las indirectas. En el primer caso, se puede detectar la presencia del patógeno o algún componente de este. Por otro lado, las indirectas buscan conocer si existe o existía alguna vez el patógeno en el individuo mediante la presencia de anticuerpos específicos generados por el sistema inmune ante la enfermedad. El inmunoensayo enzimático es el más empleado en los laboratorios clínicos, por ejemplo, la técnica de diagnóstico ELISA se basa en la generación de coloración cuando el sustrato es degradado de manera enzimática y permite la medición de manera visual o fotométrica (Law et al., 2015).

Otra técnica aplicada a la identificación de *Salmonella* spp. es la PCR. El descubrimiento y aplicación de la PCR en el año 1985 por Kary Mullis se considera uno de los avances más grandes en la biología molecular, teniendo aplicaciones muy importantes en la detección y caracterización de una amplia variedad de microorganismos (Lorenz, 2012). Dicha técnica es comúnmente utilizada en diversos campos de estudio como en el diagnóstico etiológico, para el control del tratamiento con antimicrobianos y la caracterización genética de agentes infecciosos (Costa, 2004). Presenta, además, ciertas ventajas en comparación con métodos tradicionales como los medios de cultivo, por ejemplo, una elevada sensibilidad y especificidad.

2.1.5 Control y prevención de la Salmonelosis

En relación con los tratamientos mencionados, estos han sido empleados en diferentes programas de control, vigilancia y erradicación, incrementando el éxito de estos en el manejo de varias enfermedades alrededor del mundo. Según, Miller et al. (2009) el término erradicación significa la ausencia de cualquier reporte de un caso humano o animal con la enfermedad, al igual que, la ausencia de cualquier reservorio del patógeno en el medio ambiente. Por otro lado, el mismo autor denota una diferencia en el concepto de control; los niveles de control de una enfermedad son capaces de variar, sin embargo, la erradicación solo presenta un nivel, la existencia o no del patógeno y es también, considerada como un acontecimiento a nivel mundial.

Las técnicas de prevención contra la Salmonelosis han demostrado resultados positivos en el control de la enfermedad. Algunas de estas son el acceso a agua potable, la manipulación adecuada de alimentos, la pasteurización de productos lácteos y la implementación de medidas de higiene personal (Eng et al., 2015). Lo anterior está relacionado con el manejo adecuado de los

productos derivados de aves de corral, debido a que estos suelen ser un foco importante de transmisión. En relación con esto, existen ciertos criterios que se deben seguir para la prevención de la tifosis aviar y la pulorosis en granjas como: la obtención de aves de fuentes libres de *S. Gallinarum/Pullorum*, el entorno en el cual se encuentran las aves debe ser fácil de limpiar y desinfectar, poder garantizar que los alimentos están libres de *S. Gallinarum/Pullorum* y la implementación de un programa de bioseguridad que minimiza la introducción del patógeno a través de fuentes externas (Shivaprasad, 2000).

De igual manera, otro método de prevención importante es la vacunación de las aves. La elaboración de la vacuna contra *S. Gallinarum* a partir de la cepa 9R entre los años 1995 y 2001 junto con el plan NPIP permitió la erradicación exitosa del patógeno (Andino y Hanning, 2015). Actualmente, en el mercado existen tanto vacunas inactivadas como vivas empleando dicha cepa, sin embargo, la vacuna viva presenta mayor éxito para la prevención de la tifosis aviar debido a su capacidad para controlar la colonización intestinal por la bacteria (Lee et al., 2005).

Con el fin de elaborar un plan de control exitoso se debe considerar la densidad de la población y de los posibles vectores para el patógeno, la geografía del lugar, diversas variables ambientales y ciertos criterios operacionales que permitan lograr una adecuada contención de la enfermedad (Miller et. al, 2009).

2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se basa en la amplificación de segmentos específicos de ADN empleando una enzima conocida como ADN Polimerasa y consta de 3 pasos: la desnaturalización, el alineamiento y la extensión. Dicha enzima se encarga de sintetizar una secuencia complementaria de ADN con el fin de obtener múltiples copias de este (Navarro et. al, 2015). Se deben de considerar ciertos componentes para que se lleve a cabo la reacción, tales como: el ADN molde, 2 pares de cebadores, los nucleótidos y un buffer, estos deben ser administrados en la mezcla inicial y la concentración varía según la calidad y cantidad de ADN que se obtuvo luego de la extracción. Además, es necesario el uso de un termociclador, el cual permite realizar cambios en la temperatura durante cada ciclo de amplificación y así lograr obtener un producto más específico y un mayor número de copias (Rahman et al., 2013).

Sin embargo, el método anterior ha sido sometido a una gran cantidad de variaciones a lo largo de la historia, las cuales han permitido su adaptación a pruebas o análisis específicos. Algunas de estas variaciones son: la PCR multiplex, la PCR anidada, la PCR asimétrica, la PCR inversa, la qPCR, entre otras (Rahman et al., 2013). El presente estudio se centrará en dos de estas modificaciones; la PCR punto final y la PCR tiempo real. Esta última presenta dos ventajas principales al compararla con la PCR punto final, una de estas es que se logra cuantificar el ADN inicial y el producto de la amplificación durante todo el proceso empleado fluorocromos, lo cual permite obtener resultados tanto cuantitativos como cualitativos y la otra que, se reduce la posibilidad de contaminación del producto una vez finalizada la amplificación ya que no es necesaria la manipulación de este para poder visualizar los resultados (Navarro et. al, 2015).

En la qPCR se logran identificar tres fases durante el proceso: la exponencial, la lineal y plateau. La fase exponencial hace referencia al comienzo de la reacción en donde el ADN diana se duplica en cada ciclo, por lo tanto, es el punto de máxima eficiencia. En la segunda fase se da una disminución en la eficiencia y rapidez de la reacción al haberse utilizado la mayoría de los componentes iniciales de la PCR y en la última fase se detiene por completo la reacción debido al agotamiento de tales componentes (Fraga et al., 2014). Para realizar dichas cuantificaciones es necesario el uso de un termociclador especializado compuesto por una fuente de luz de excitación como una lámpara o un láser, un fluorómetro o detector de fluorescencia y un programa capaz de formular una curva de amplificación según los datos de fluorescencia registrados (Navarro et al., 2015).

En relación con la técnica anterior, esta se puede clasificar según el tipo de agente o fluorocromo empleado y la especificidad de la reacción. Se pueden utilizar fluorocromos intercalantes como SYBRGreen® o EvaGreen® que permiten la detección de amplificaciones específicas y no específicas (Navarro et al., 2015). El principio de estos agentes reside en un incremento en la emisión de fluorescencia al unirse con ADN de doble hebra, esto es detectado por un termociclador y traducido en una amplificación del ADN. La desventaja que presentan estos agentes es la dificultad en lograr una detección de segmentos específicos de ADN ya que la unión se da a cualquier ADN de doble hebra. Sin embargo, continúa siendo uno de los más empleado en los laboratorios moleculares debido a su bajo costo y su seguridad en comparación con el uso de agentes como Bromuro de Etidio (Fraga et al., 2014).

Por otro lado, también existen otros fluorocromos los cuales se encuentran unidos en cada extremo de un oligonucleótido o sonda; un donador en el 3' y un aceptor en el 5'. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET por sus siglas en inglés). Cuando dicho oligonucleótido se encuentra unido al ADN diana y los fluorocromos en proximidad uno del otro no se llevará a cabo dicha transferencia y por ende no se emitirá fluorescencia. Sin embargo, una vez que se da la amplificación, la ADN polimerasa hidroliza el extremo 5' de la sonda causando la separación de ambos fluorocromos y permitiendo así que el detector capte la fluorescencia emitida por el donador. Lo anterior permite la detección de productos específicos (Costa, 2004). Tanto la PCR Punto Final como la qPCR han sido empleadas en la detección de *Salmonella* spp., logrando la identificación de la bacteria a nivel de biotipo, diferenciando, por ejemplo, entre *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* con el uso de cebadores específicos para cada uno (Batista et al., 2013; Rubio et. al, 2017).

2.2.1 Optimización de la PCR y secuenciación de ADN

Ambos métodos de PCR mencionados deben ser optimizados para incrementar su eficiencia durante el proceso. Para tal efecto, se pueden variar los diferentes compuestos empleados durante la reacción o modificar las condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador. Un claro ejemplo de esto es la formulación de cebadores específicos, que logren amplificar de la mejor manera el producto esperado. Uno de los cebadores debe de estar orientado en la dirección 5' -> 3' o en el sentido de la amplificación y el otro debe ser el antisentido o 3' -> 5' (Lorenz, 2012). Tal componente es esencial en el proceso de amplificación, ya que un diseño erróneo de estos podría generar amplificaciones inespecíficas o uniones entre los cebadores, conocidas como dímeros de cebadores que resulta en una reacción ineficiente o en un fallo completo del proceso (Raymaekers et al., 2009).

En lo que respecta a la qPCR, el análisis mediante la curva estándar es crítica para la estandarización del proceso, con esta es posible calcular la eficiencia de la reacción. La construcción de dicha curva se basa en graficar los ciclos de amplificación (Ct) contra el logaritmo de la concentración inicial de ADN y a partir de esto, se formula una regresión lineal entre ambos para obtener la curva de mejor ajuste, al igual que, el valor del coeficiente de correlación (R²) el cual indica que tanto se dispersan los datos de una línea central (Kang, 2019). Dicho lo anterior,

Raymaekers et al. (2009) recomiendan realizar las amplificaciones por triplicado y analizar la curva estándar al menos 10 veces en días diferentes para obtener así datos más confiables.

Al igual que los componentes de la mezcla, el equipo utilizado también juega un papel muy importante en el proceso. El uso de termocicladores más avanzados que requieren un menor volumen de reacción permite reducir el tiempo de amplificación e incluso analizar un mayor número de muestras de manera simultánea. En relación con lo anterior, la idea principal de optimizar una técnica es reducir el tiempo y costo de trabajo sin poner en riesgo la especificidad o la sensibilidad de la prueba (Bustin, 2017). Cabe destacar que, la técnica de PCR se encuentra estrechamente relacionada con la secuenciación de ADN, ya que esta permite obtener información valiosa respecto al producto de PCR obtenido, por ejemplo, corroborar la identificación de una especie mediante su secuencia de ADN, confirmar la especificidad de la amplificación o identificar variaciones en la secuencia de ADN como polimorfismos o translocaciones, por lo tanto se recomienda realizarla durante la optimización de la técnica (Bevan et al., 1992).

Según la OIE algunos de los parámetros que se deben evaluar para la adecuada optimización o estandarización de una técnica de PCR son: la especificidad, la sensibilidad, la repetibilidad y la reproducibilidad. El estudio de la especificidad se basa en analizar muestras de animales de referencia para los cuales se conoce con certeza que no están infectados por lo que darán un valor negativo en la prueba, mientras que, para la sensibilidad se utilizan animales de referencia que si se encuentran infectados. Por lo tanto, la especificidad y la sensibilidad permiten conocer los valores predictivos de los resultados, con los cuales es posible calcular la tasa de positivos y negativos al realizar la prueba (OIE Terrestrial Manual, 2018c).

La repetibilidad y la reproducibilidad tienen como fin evaluar la concordancia entre los resultados de la misma prueba. En el primer caso se comparan los resultados de las réplicas de una muestra empleando los mismos equipos y condiciones de laboratorio, conociendo de esta manera que tanta variación existe dentro de un mismo ensayo. Mientras que, para analizar la reproducibilidad de la prueba, esta se lleva a cabo en un laboratorio diferente empleando los mismos reactivos, protocolos y controles iniciales, permitiendo de esta manera conocer la precisión del ensayo al realizarse bajo condiciones diferentes (OIE Terrestrial Manual, 2018c).

3. Marco Metodológico

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de PCR Punto Final y qPCR para la detección del serotipo *S. Gallinarum* empleando muestras provenientes de cepas bacterianas y tejidos biológicos obtenidos a partir de aves de corral brindadas por el Laboratorio de Bacteriología del SENASA. Los productos de PCR obtenidos en el proceso de optimización fueron confirmados mediante secuenciación y un posterior análisis bioinformático, garantizando de esta manera una detección confiable del patógeno. El proyecto se llevó a cabo en el Área de Bacteriología del SENASA, ubicado en el campus Benjamín Núñez de la Universidad Nacional de Costa Rica, en el Laboratorio de Análisis Genómicos (LAGEN) y el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP), ambos ubicados en el campus Omar Dengo de la Universidad Nacional.

3.1. Cultivo bacteriano

A partir de un cepario de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum perteneciente al Laboratorio de Bacteriología del SENASA se cultivaron 4 muestras provenientes de un brote reportado en el 2013, 8 cepas ATCC y 2 cepas vacunales (Anexo 1) en medio Trypticase Soya a 37 °C durante 24 horas. Se realizaron análisis de control de calidad para cada uno de los cultivos. Este consistió en un rayado en placa con medio Trypticase Soya de todas las muestras junto con las cepas 7 y 8 como referencia (Anexo1). Estas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se observó la morfología y coloración de las colonias comparándolas con las de referencia con el fin de garantizar el crecimiento de una única cepa bacteriana y descartar de esta manera la posible contaminación con otros microorganismos.

3.2. Extracción de ADN bacteriano

Se realizaron extracciones de ADN para cada una de las cepas empleando el kit de extracción DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Alemania) y siguiendo el protocolo brindado por el fabricante. Una vez finalizado el proceso, las extracciones fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

3.3. Cuantificación del ADN extraído

El ADN genómico bacteriano se cuantificó mediante fluorescencia con el equipo Qubit 3.0 (Invitrogen de Life Technologies). Para calcular la cantidad de reactivo necesario para la cuantificación de cada muestra se siguió el protocolo brindado por el mismo equipo. El kit empleado para las mediciones fue el Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) el cual es específico para la detección de ADN de doble hebra. Se procedió a escoger las réplicas con una mayor concentración de ADN para las amplificaciones. La pureza de las extracciones fue evaluada mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Además, para confirmar la presencia e integridad del ADN genómico, este se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE (Tris-Borato) 0.5X junto con el marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler de 1Kb (Thermo Scientific). Lo anterior se reveló y documentó en un transiluminador (Uvitec UVIdoc HD2 Gel Documentation System).

3.4. Optimización de la PCR Punto Final y la qPCR

El proceso de optimización se llevó a cabo inicialmente con la PCR Punto Final y los resultados obtenidos a partir de esta se utilizaron como referencia para optimizar la qPCR. Se emplearon los cebadores propuestos por Xiong et al., (2016) para la optimización de ambas técnicas (Cuadro 1). Siendo la región bacteriana amplificada, un fragmento del gen que codifica la proteína biosintética flagelar (Flagellar biosynthetic protein, FlhB). Esta corresponde a una proteína de membrana altamente conservada en el sistema de secreción flagelar de bacterias. A pesar de que *S. Gallinarum* no es capaz de formar flagelos presenta los genes estructurales para la codificación de flagelina y, por lo tanto, es posible emplear dichos cebadores para su detección. Como control positivo se utilizó la cepa Vacunal SG 9R de *S. Gallinarum* (Nobilis®), Intervet International).

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores *flhB* (Forward y Reverse)

Cebador	Secuencia 5'-> 3'	Producto (<i>S. Gallinarum</i> / otros serotipos de <i>Salmonella</i> spp.)
<i>flhB</i> -F	TTC GCG ACG AAT TTA AAG AGA GCG AAG	182 pb/ 379pb
<i>flhB</i> -R	CAG CGT TTA AGC TGC CAG ACC CAG GCC	

Se utilizó el Master Mix GoTaq® G2 Hot Start Green (Thermo Fisher Scientific, USA) y EvaGreen® (Qiagen, Alemania) para la PCR Punto Final y qPCR respectivamente. Se empleó el equipo Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf, Alemania) para la optimización con PCR punto final y el equipo QuantStudio™ Flex 6 (Applied Biosystems) para la qPCR. El volumen final de reacción fue de 25 µL (Cuadro 2).

Cuadro 2. Volúmenes y concentración para la mezcla de reacción de ambas técnicas de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Volumen por reacción (muestra)	Concentración final
Master Mix GoTaq® G2 Hot Start Green o EvaGreen®	2X	12.50 µL	1X
Cebador <i>flhB</i> (Forward)	30 µM	0.33 µL	0.4 µM
Cebador <i>flhB</i> (Reverse)	30 µM	0.33 µL	0.4 µM
Agua grado PCR		9.84 µL	
ADN genómico	_____	2.00 µL	_____

Cabe mencionar que, para optimizar esta técnica las modificaciones se basaron en lo establecido por Xiong et al., (2016) para la amplificación de *S. Gallinarum*/*Pullorum* con los cebadores anteriormente mencionados. Por lo tanto, el perfil térmico utilizado como base para la PCR punto final consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 4 segundos, 59 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Mientras que, en la programación para la qPCR se eliminaron ambos pasos de “extensión”.

Con el fin de determinar la temperatura de hibridación ideal para los cebadores se empleó la Ecuación 1 (Iqbal et al., 2020) para calcular la temperatura de fusión y se restaron 5 °C al

resultado obtenido. Este dato, junto con el del artículo de referencia fueron la base para generar un gradiente de temperatura a lo largo del bloque durante la etapa de hibridación. Se utilizó la muestra control (cepa vacunal SG 9R) y se evaluaron temperaturas desde 56 °C hasta 68.4 °C, por lo tanto, cada una de las réplicas fue sometidas a diferentes temperaturas de hibridación.

$$T_m = 64.9 + 41 \frac{(yG+zC-16.4)}{(wA+xT+yG+zC)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde w,x,y y z corresponden al número de los oligonucleótidos A, T, G y C que conforman el cebador, respectivamente.

Por otro lado, se realizó una evaluación de la eficiencia (E) de la reacción mediante qPCR llevando a cabo un análisis de la curva estándar. Para esto, se realizaron 4 diluciones seriadas 1:5 de la muestra control, partiendo con una concentración inicial de 20 ng/μL. Por lo tanto, la curva se construyó con un total de 5 puntos, cada uno por triplicado. A partir de la pendiente generada con dicha curva se determinó la eficiencia de la reacción empleando la siguiente ecuación (Nurjanah et al., 2018):

$$E = \{(10^{-1/\text{pendiente}}) - 1\} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

La especificidad de los cebadores se evaluó mediante una curva de disociación utilizando la cepa control de *S. Gallinarum* y la cepa ATCC 13076 de *Salmonella* Enteritidis.

Para la visualización de los resultados de la PCR punto final se realizó una electroforesis capilar con el equipo Qiaxcel Advanced (Qiagen) utilizando el cartucho QIAxcel DNA High Resolution, el marcador de peso molecular de 25-500 pb (número de catálogo 929560), el marcador de alineamiento 15 bp/600 bp (QX Alignment Marker, número de catálogo 929530), el método de inyección OM800 el cual brinda una resolución con diferencias de 3-5 pb y el resultado final se obtuvo con el QIAxcel ScreenGel Software v1.5.

3.4.1. Secuenciación del producto de PCR y análisis bioinformático

Con el fin de confirmar la identidad de las amplificaciones de una región parcial del gen *flhB* y a su vez la especificidad de la técnica se realizó una secuenciación de los productos positivos de la PCR punto final de los siguientes aislados: cepa 2, cepa 4, cepa 5, cepa 6, cepa 9, cepa 10 y cepa 11. Para ello, primero se realizó una purificación de los productos de PCR mediante una precipitación con isopropanol para luego ser enviadas para su secuenciación en el LAGEN de la Escuela de Ciencias Biológicas de la UNA en donde se utilizó el equipo Analizador Genético ABI 3500 (Applied Biosystems) para una secuenciación Sanger en dos direcciones.

Para el análisis de posicionamiento taxonómico las secuencias obtenidas se editaron en el programa Geneious versión R9 (Biomatters) por medio de edición manual. Para reconocer preliminarmente su identidad taxonómica a nivel de género, las secuencias fueron evaluadas en el programa en línea BLASTn (Chen et al., 2015), mediante parámetros por defecto y disponible en National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Anexo 5). Se realizó un alineamiento múltiple con el programa MAFFT v7.308 (Kato y Standley, 2013) empleando el método iterativo de refinamiento G-INS-i (1PAM/k= 2), luego una selección de bloques conservados mediante los parámetros por defecto del programa en línea Gblocks (Castresana, 2000). Para el bloque obtenido de las secuencias de la región génica Flagellar biosynthetic protein (FlhB) (181 posiciones informativas), se determinó el modelo de sustitución nucleotídica con el programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) arrojando que el mejor modelo ajustado a la matriz fue el K2P. Seguidamente, con la plataforma en línea IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) (Nguyen et al., 2015; Trifinopoulos et al., 2016) se obtienen las inferencias topológicas de posicionamiento taxonómico por máxima verosimilitud con el uso de un algoritmo estocástico. Los parámetros empleados para la inferencia filogenética fueron el uso de heterogeneidad de tasa libre, cálculo de soporte de los nodos derivado del método bootstrap UFboot con 5000 permutaciones (Minh et al., 2013), con un máximo de 5000 iteraciones y un test de rama única (SH-aLRT) con 5000 réplicas. Finalmente, los árboles obtenidos se visualizaron y editaron con el programa FigTree v1.4 (Rambaut 2009).

3.4.2. Estudio de especificidad y sensibilidad diagnóstica de la PCR

La especificidad y sensibilidad se evaluaron mediante la amplificación por PCR punto final de cepas tanto de *Salmonella* spp. como de otros géneros. Se utilizaron todas las cepas presentes en el Anexo 1 por duplicado, por lo tanto, se validaron un total de 28 reacciones de PCR. La cepa Vacunal SG 9R de *S. Gallinarum* se empleó como control positivo. Para calcular ambos parámetros, se aplicaron las Ecuaciones 3 y 4 (Trevethan, 2017).

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{verdaderos negativos}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

En dichas ecuaciones se definió como verdaderos positivos a la visualización de una banda (amplificación) en el gel de agarosa de 182 pb donde se encuentra el patógeno de interés (*S. Gallinarum*), mientras que, los verdaderos negativos como la ausencia de bandas de 182 pb en donde se encuentran las bacterias diferentes a *S. Gallinarum* y los falsos positivos cuando se visualizó una banda donde no se encontraba dicho patógeno.

3.4.3. Estudio del límite de detección (sensibilidad analítica)

Para determinar el menor número de células que pueden ser detectadas mediante PCR punto final, la cepa vacunal SG 9R fue ajustada a una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL correspondiente al patrón 0,5 de McFarland y a partir de dicha suspensión se realizaron diluciones seriadas 1:10 desde 10^{-1} hasta 10^{-8} en caldo Tripticasa Soya. Luego se sembraron 0.01mL de cada dilución por triplicado en diferentes placas Petri con medio Tripticasa Soya y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se realizó un recuento en placa de las unidades

formadoras de colonias (UFC) y un análisis por PCR punto final a partir de las colonias obtenidas en cada una de las placas (Anexo 8).

De manera similar, se evaluó la concentración más baja de ADN genómico con el cual aún se puede detectar *S. Gallinarum* mediante PCR punto final. Para ello se realizaron diluciones seriadas 1:5 del ADN de la cepa vacunal SG 9R, partiendo de una concentración de 20 ng/ μ L hasta 1.28 pg/ μ L y amplificando cada una de las diluciones mediante PCR punto final. Utilizando los resultados de este análisis como guía, se realizaron diluciones seriadas 1:10 desde 10^{-1} hasta 10^{-10} de la misma cepa con el fin determinar el límite de detección mediante qPCR. Se amplificaron únicamente las diluciones de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} . En este caso el valor de Ct establecido como corte para considerar el resultado como positivo fue de 35 (OIE Terrestrial Manual, 2018a).

3.4.4. Análisis de repetibilidad y reproducibilidad

Ambas técnicas (PCR punto final y qPCR) fueron validadas mediante una prueba de repetibilidad (análisis intralaboratorio) realizada en el Laboratorio de Bacteriología del SENASA utilizando los mismos materiales y condiciones de laboratorio durante cada ensayo. Para la PCR punto final se realizó un ensayo utilizando 3 muestras positivas (cepa 1, cepa 5 y cepa 11) y 2 negativas para *S. Gallinarum* (cepa 8 y 9), en este caso se emplearon 10 réplicas de cada una de las muestras y se analizó la concordancia entre los resultados de las réplicas. Mientras que, para la qPCR se llevó a cabo la amplificación de 5 diluciones 1:5 de la cepa vacunal SG 9R la cual se encontraba a una concentración inicial de 20 ng/ μ L.

Por otro lado, la reproducibilidad (análisis interlaboratorio) de ambas técnicas se analizó realizando comparaciones entre los resultados de repetibilidad obtenidos en diferentes laboratorios, validando así la prueba bajo condiciones experimentales diferentes. Para la PCR punto final se realizaron comparaciones entre el Laboratorio de Bacteriología del SENASA y el LAGEN. Mientras que, para la qPCR se compararon resultados entre el Laboratorio de Bacteriología del SENASA y el LBP de la UNA. Los termocicladores utilizados en SENASA fueron el Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf, Alemania) y el QuantStudio™ Flex 6 (Applied Biosystems) para la PCR Punto Final y la qPCR respectivamente. En el LAGEN la PCR

Punto Final se llevó a cabo con el equipo ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, USA) y en el LBP con el LightCycler® 96 Instrument (Roche) para la qPCR.

3.4.5 Análisis estadístico

Para determinar la reproducibilidad de la técnica de PCR punto final se elaboró una tabla de contingencia 2X2 (Cuadro 3) comparando los resultados del SENASA (Laboratorio 1) con los del LAGEN (Laboratorio 2). Con los datos obtenidos de la tabla se calculó el índice de Kappa (Ecuación 5) y se realizó la prueba de Mc Nemar (Ecuación 6).

Cuadro 3. Tabla de contingencia 2X2

		Variable 2		Total
		Positivo	Negativo	
Variable 1	Positivo	Verdadero Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	b1
	Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)	b2
	Total	a1	a2	N

$$K = \frac{N(VP+VN)-(a1*b1+a2*b2)}{N^2-(a1*b1+a2*b2)} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$X^2_{Mc} = \frac{(FP-FN)^2}{FP+FN} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Se determinó si los datos son estadísticamente similares mediante la comparación del resultado de la prueba de Mc Nemar con un valor tabular de Chi Cuadrado de $X^2_{Chi} = 3.84$, utilizando como criterio de decisión un nivel de significancia de 0.05 y un grado de libertad (Díaz et al., 2017). Para lo anterior se establecieron las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula (Ho): No existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del Laboratorio 1 y el Laboratorio 2.

Hipótesis Alternativa (H1): Existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del Laboratorio 1 y el Laboratorio 2.

Por último, para determinar el grado de concordancia entre los diferentes días, se comparó el índice de Kappa con los valores del Cuadro 4.

Cuadro 4. Interpretación de los valores de Kappa (Díaz et al., 2017)

Valor de Kappa	Grado de concordancia
< 0	Malo
0 – 0.20	Bajo
0.21- 0.40	Aceptable
0.41- 0.60	Moderado
0.61- 0.80	Substancial
0.81 – 1.00	Excelente

La repetibilidad de la prueba mediante qPCR se obtuvo calculando el valor de la desviación estándar (DS) y el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) para las siguientes concentraciones por triplicado: 20 ng/μL, 4 ng/μL, 0.8 ng/μL, 0.16 ng/μL, 0.032 ng/μL y 0.0064 ng/μL de la cepa control (SG 9R) en una misma corrida en el termociclador QuantStudio™ Flex 6 (Applied Biosystems). Mientras que, para calcular la reproducibilidad de la misma prueba se compararon los datos de DS y % CV obtenidos en diferentes laboratorios utilizando las concentraciones mencionadas.

3.4.6 Detección de *S. Gallinarum/Pullorum* en tejidos biológicos

Con el fin de evaluar la aplicabilidad de la técnica de PCR para detectar *S. Gallinarum/Pullorum* directamente en muestras de tejido biológico, es decir, sin requerir de un aislamiento y obtención de un cultivo puro, se realizó una extracción de ADN genómico de muestras congeladas de hígado (D5242-18) y médula ósea (D1748-18) los cuales fueron previamente confirmados como positivos para *S. Gallinarum/Pullorum* mediante cultivo bacteriano, pruebas serológicas y bioquímicas. Se empleó el kit de extracción DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Alemania) y se siguió el protocolo brindado por este. El ADN extraído se amplificó mediante PCR punto final junto con los cebadores y el control positivo previamente

mencionados. Además, debido a que las muestras de tejido habían permanecido congeladas por un período de tiempo prolongado, con el fin de confirmar la presencia de colonias se llevó a cabo un cultivo en placas con medio XLD durante 24 horas a 37 °C para cada una de las muestras. Todas las muestras de tejido biológico fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología del SENASA.

4. Resultados y discusión

4.1 Optimización de la PCR Punto Final y la qPCR

Los análisis iniciales de control de calidad (Anexo 3) indicaron que no hubo contaminación con otras bacterias y, por lo tanto, fue posible emplear dichas cepas en el estudio. Además, al realizar la evaluación del ADN extraído no se observó degradación de este y las bandas obtenidas son de un alto peso molecular (Anexo 4) lo cual indica que se logró extraer ADN genómico. Al analizar la pureza de las extracciones (Anexo 2) mediante la relación de absorbancia 260/280 ($A_{260/280}$) se obtuvieron valores cercanos a 1.8 indicando una baja contaminación con proteínas. En la relación de $A_{260/230}$ se obtuvieron valores por debajo de 1.8 lo cual podría deberse a una posible contaminación con carbohidratos, fenol o sales (Lorenz, 2012). Según Koetsier y Cantor (2019) esto ocurre al utilizar una técnica de extracción basada en columnas, ya que algunos de los Buffers utilizados contienen hidrocloreuro de guanidina la cual absorbe a dichas longitudes de onda. Sin embargo, la PCR no fue inhibida por los contaminantes presentes en las extracciones y fue posible amplificar cada una de las muestras bajo estudio.

El valor obtenido para la temperatura de hibridación a partir de la Ecuación 1 fue de 57 °C y al emplear el gradiente de temperatura se observó una amplificación positiva desde 56 °C hasta 68.4 °C (Figura 1, A). Sin embargo, en la tabla de resultados se evidenció una mayor concentración de la secuencia de interés (182 pb) y menos secuencias inespecíficas como las de 190 pb al emplear una temperatura de 59 °C (Figura 1, B) por lo tanto, se optó por utilizar esta temperatura durante la etapa de hibridación con el fin de mantener una alta especificidad durante las pruebas. Según Roux (2009) la temperatura de hibridación puede verse afectada por múltiples factores, tales como

el buffer, la concentración del cebador o el ADN utilizado durante la reacción, por lo tanto, cualquier calculo empleado para obtener dicha temperatura debe considerarse como una aproximación.

Para la etapa de hibridación se ha establecido un rango estándar entre 52 °C a 58 °C, el cual se puede aplicar a cualquier protocolo de PCR como base para su optimización. Sin embargo, según el nivel de especificidad que se desea, este valor podría incrementar (Lorenz, 2012). Los resultados del ensayo demostraron que la temperatura seleccionada fue óptima para permitir una unión adecuada de los cebadores sin generar durante el proceso productos inespecíficos que podrían alterar la eficiencia de la reacción.

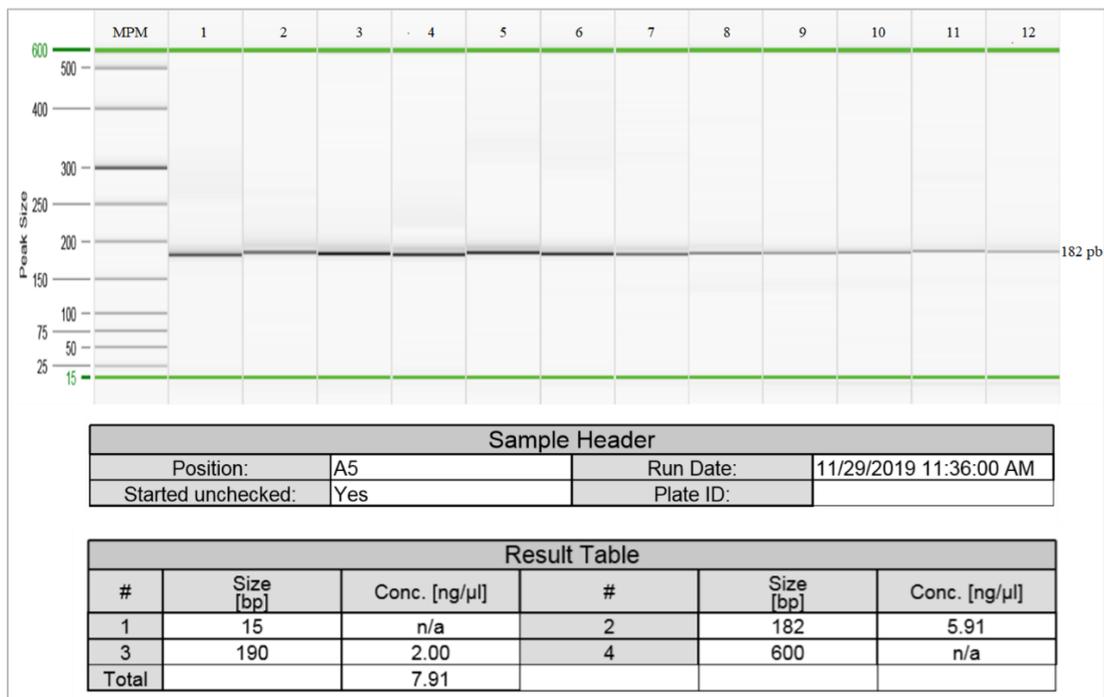


Figura 1. Electroforesis capilar para la determinación de la temperatura de hibridación empleando la cepa de *S. Gallinarum* (Vacunal SG 9R). Del carril 1 al 12, 56.0 °C, 56.4 °C, 57.1°C, 58.6 °C, 59.9 °C, 61.4 °C, 63.0 °C, 64.5 °C, 66.1 °C, 67.3 °C, 68.0 °C y 68.4 °C, respectivamente (A);
Tabla de resultado de la electroforesis capilar (B).

La eficiencia obtenida a partir de la curva estándar y la Ecuación 2 fue de E= 103 %, con un R² de 0.998. Los valores de Ct se mantuvieron entre 13.633 y 22.614. Por lo tanto, este resultado demuestra que el producto de la amplificación se duplica en cada uno de los ciclos hasta completar

los 40 ciclos (Figura 2, A y B). Según Nurjanah et al. (2018) el porcentaje de eficiencia aceptable para una qPCR se debe encontrar entre 90 % y 110 % con una pendiente de -3.6 a -3.1. En el presente estudio se reportó una elevada eficiencia con un coeficiente de regresión (R^2) cercano a 1.0, lo cual demuestra una elevada correlación entre los valores de Ct y la cantidad de ADN (Álvarez et al., 2018).

Este resultado demuestra que durante la etapa exponencial de la reacción existe una duplicación del ADN molde luego de cada ciclo permitiendo así obtener una elevada eficiencia. Dichos resultados son comparables con los obtenidos por Heymans et al. (2018), los cuales reportaron una eficiencia de 103.8% para la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis mediante qPCR.

En cuanto a la curva de disociación que se obtuvo para los diferentes serotipos de *Salmonella* spp. se observó un único pico con temperaturas diferentes para cada uno de los productos de PCR (182 pb y 379 pb) por lo tanto, no se formaron dímeros de cebadores y estos fueron altamente específicos para la secuencia de interés (Figura 2, C).

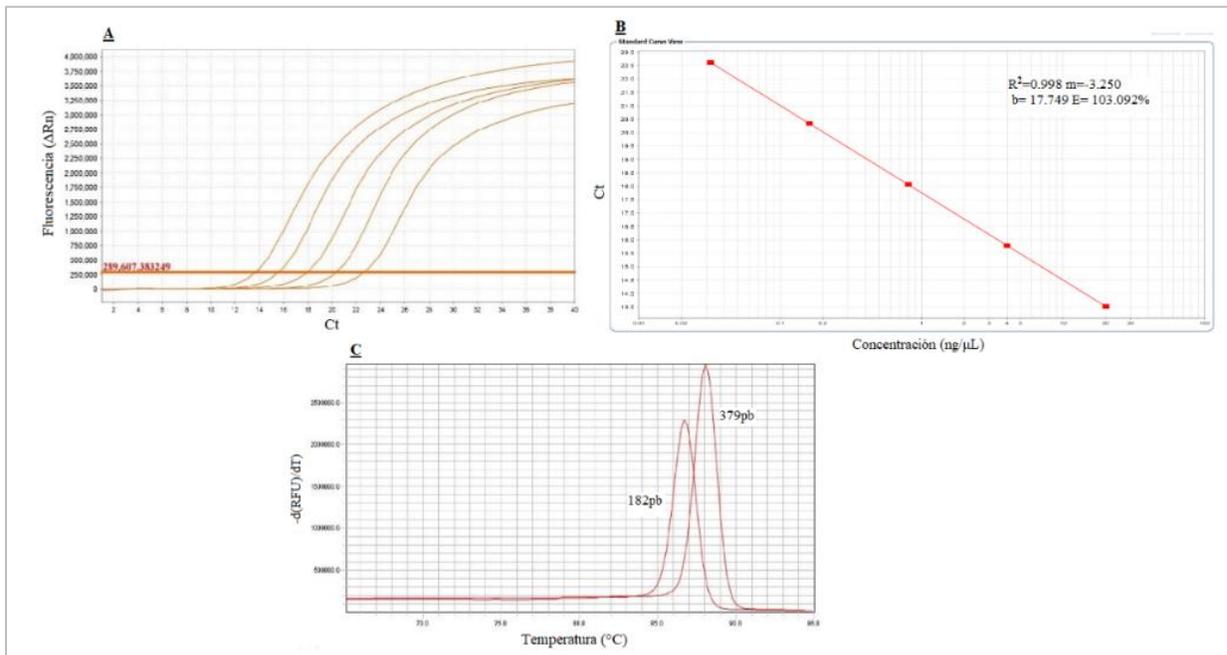


Figura 2. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas del ADN de la cepa vacunal SG 9R (A), curva estándar (B) y curvas de disociación obtenida mediante qPCR para *S. Gallinarum* (182 pb) y *S. Enteritidis* (379 pb) (C).

4.2 Análisis bioinformático de la secuenciación

El posicionamiento taxonómico de las muestras secuenciadas se comprobó mediante un árbol filogenético (Figura 3). Las cepas de *S. Gallinarum*/*Pullorum* se agruparon junto con cepas de la NCBI que pertenecían a la misma especie, lo mismo ocurrió con las cepas de serotipos diferentes al de *S. Gallinarum*. El valor de soporte para las ramas fue de 81.1/64. Los resultados permitieron corroborar la identidad de las cepas bajo estudio, por lo tanto, se establece una buena especificidad de los cebadores para amplificar el gen de interés. Liu et al. (2017) observó una agrupación similar entre los diferentes serotipos de *Salmonella* spp. al analizar los genes de flagelina. En dicho estudio los serotipos *S. Gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Stanleyville*, *S. Dublin* y *S. Typhimurium* se posicionaron en un mismo clúster correspondiente a las especies monofásicas mientras que *S. Infantis* y *S. Anatum* se agruparon con las especies difásicas. Sin embargo, debido a que todas pertenecen a la misma subespecie la distancia entre grupos fue corta. Se debe considerar que, los cebadores utilizados en el presente estudio amplifican un fragmento muy pequeño (182 pb) de *Salmonella* spp. afectando la capacidad de resolución para diferenciar entre los diferentes serotipos de la especie debido a un bajo número de posiciones informativas obtenidas.

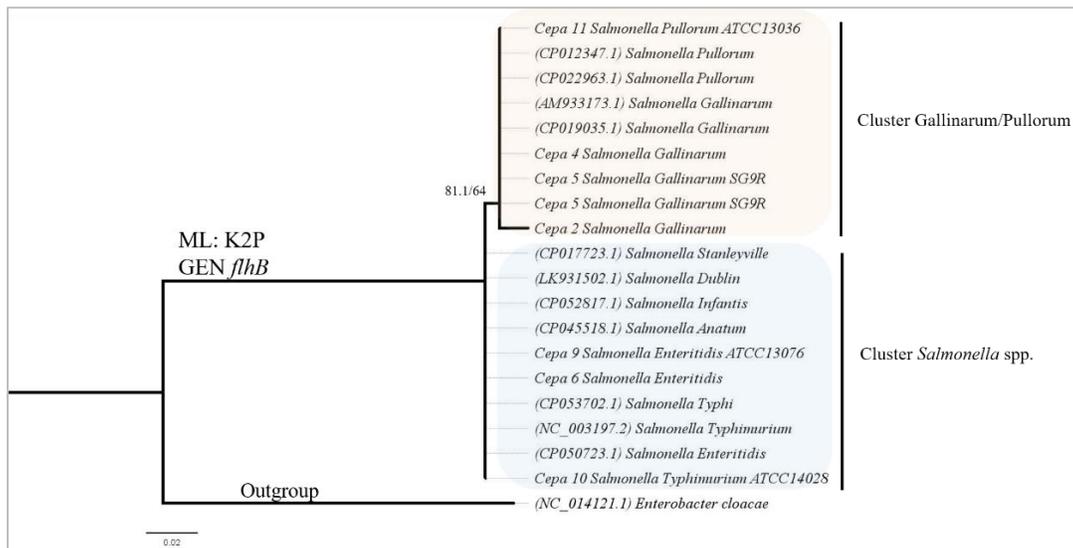


Figura 3. Árbol filogenético basado en el método de máxima verosimilitud (ML) de los fragmentos del gen *flhB*. El soporte de cada una de las ramas se muestra como SHaLRT (Test de rama única)/UFBoot (Bootstrap ultra rápido). En cada rama se muestra el número de accesoión GenBank utilizado para el análisis. La especie *Enterobacter cloacae* se utilizó como grupo externo.

4.3 Estudio de especificidad y sensibilidad diagnóstica de la PCR

Se obtuvo una especificidad y una sensibilidad del 100 % para la PCR punto final (Figura 4) al emplear las ecuaciones 3 y 4 respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Lavalett et al. (2009) durante la validación de una PCR múltiple. Estos reportaron valores entre 98 % y 100 % para la sensibilidad y entre 96 % y 100 % para la especificidad al emplear dos cebadores diferentes para la detección de 4 serotipos de *Salmonella* spp. de importancia clínica. Por otro lado, Xiong et al. (2016) obtuvo un valor del 100 % para ambos parámetros empleando 27 serotipos diferentes de *Salmonella* spp. y utilizando el mismo cebador (*flhB*) y técnica de PCR. Según la OIE Terrestrial Manual (2018c) el valor de dichos parámetros debe ser cercano al 99 % si se utilizan un número de muestras igual o menor a 15. Por lo tanto, con los resultados obtenidos en el presente estudio se demuestra la capacidad de los cebadores utilizados de amplificar de manera eficiente el gen de interés en diferentes serotipos de *Salmonella* spp.

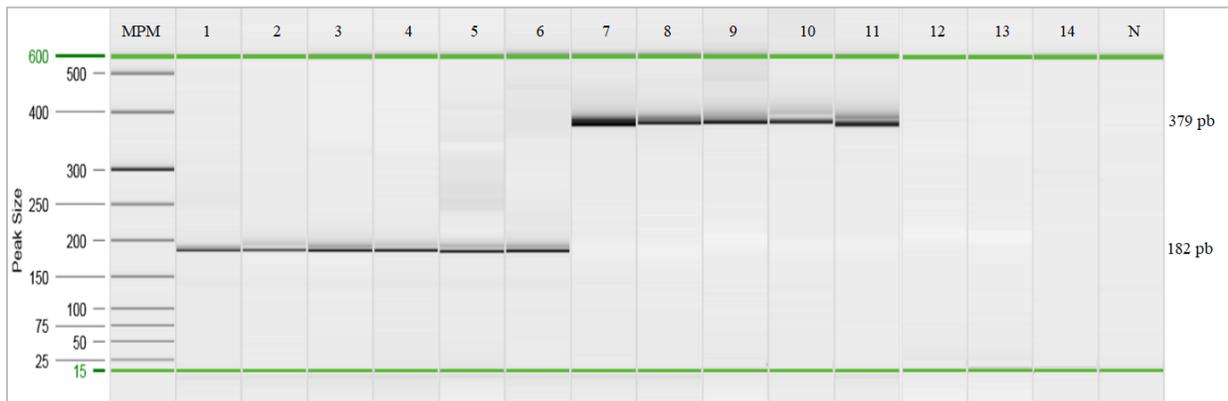


Figura 4. Electroforesis capilar para la determinación de la especificidad y sensibilidad.; de izquierda a derecha: (M) Marcador Molecular (25pb a 500pb); ADN de *S. Gallinarum* cepa 1, 2, 3 ,4 ,5 y 11; *S. Enteritidis* cepa 9 y 6; *S. Abaetetuba* cepa 8; *S. Choleraesuis* cepa 7; *S. Typhimurium* cepa 10; *P. multocida* cepa 14; *S. aureus* cepa 12; *E. coli* cepa 13; (N) Control Negativo (agua grado PCR).

4.4 Límite de detección (sensibilidad analítica)

Se logró observar la formación de colonias hasta la dilución 10^{-6} (Anexo 6) y al realizar la PCR punto final de cada dilución se obtiene un límite de detección para células bacterianas viables de 3×10^2 UFC/mL (Figura 5, izquierda). Esto concuerda con el reportado por Xiong et al. (2018)

para la detección de *S. Gallinarum/Pullorum*. En dicho estudio, se obtuvo un límite de detección de 1×10^2 UFC/mL empleando cebadores dirigidos al gen *ratA*.

En cuanto al límite de detección para el ADN genómico mediante PCR punto final este fue de $6.4 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (Figura 5, derecha) el cual se aproxima al obtenido por Xiong et al. (2016), quienes reportaron un valor de $5.85 \text{ pg}/\mu\text{L}$ empleando el mismo cebador. Los análisis del límite de detección para células o ADN permiten valorar la capacidad que tiene la técnica de PCR en detectar concentraciones muy bajas del analito, contribuyendo en una detección más precisa en muestras con una baja carga del patógeno.

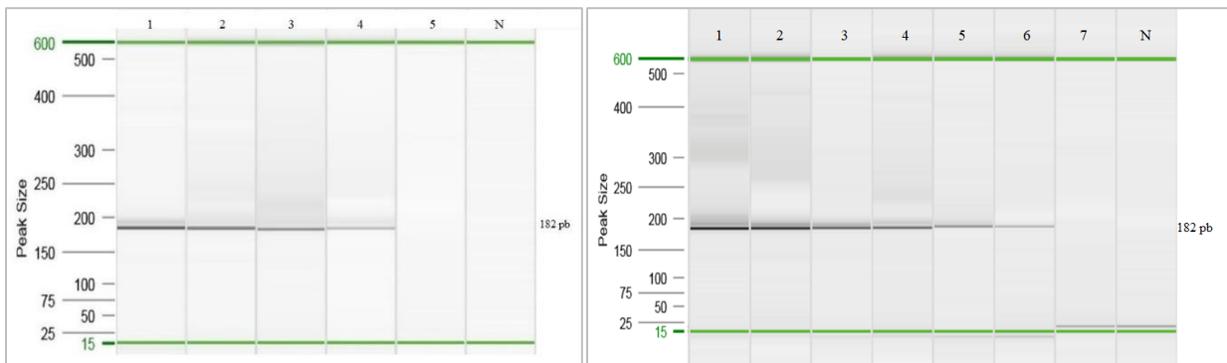


Figura 5. Electroforesis capilar para la determinación del límite de detección de células bacterianas viables y ADN genómico. Izquierda: (1) 1×10^5 UFC/mL; (2) 1×10^4 UFC/mL; (3) 2×10^3 UFC/mL; (4) 3×10^2 UFC/mL; (5) 1×10^2 UFC/mL; (N) Control Negativo (agua grado PCR). Derecha: (1) $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$; (2) $4 \text{ ng}/\mu\text{L}$; (3) $800 \text{ pg}/\mu\text{L}$; (4) $160 \text{ pg}/\mu\text{L}$; (5) $32 \text{ pg}/\mu\text{L}$; (6) $6.4 \text{ pg}/\mu\text{L}$; (7) $1.28 \text{ pg}/\mu\text{L}$; (N) Control negativo (agua grado PCR)

El límite de detección obtenido para la qPCR fue de $2 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (dilución de 10^{-9}) con un valor de Ct de 34.501 ± 0.133 lo cual equivale a 10 copias de ADN por reacción (Figura 6). De igual manera, autores como Braun y Methner (2011) obtuvieron el mismo número de copias de ADN al validar la qPCR para la detección de *Salmonella* spp. y afirman que este valor cumple con los estándares internacionales según ISO 6579:2002 Anexo D.

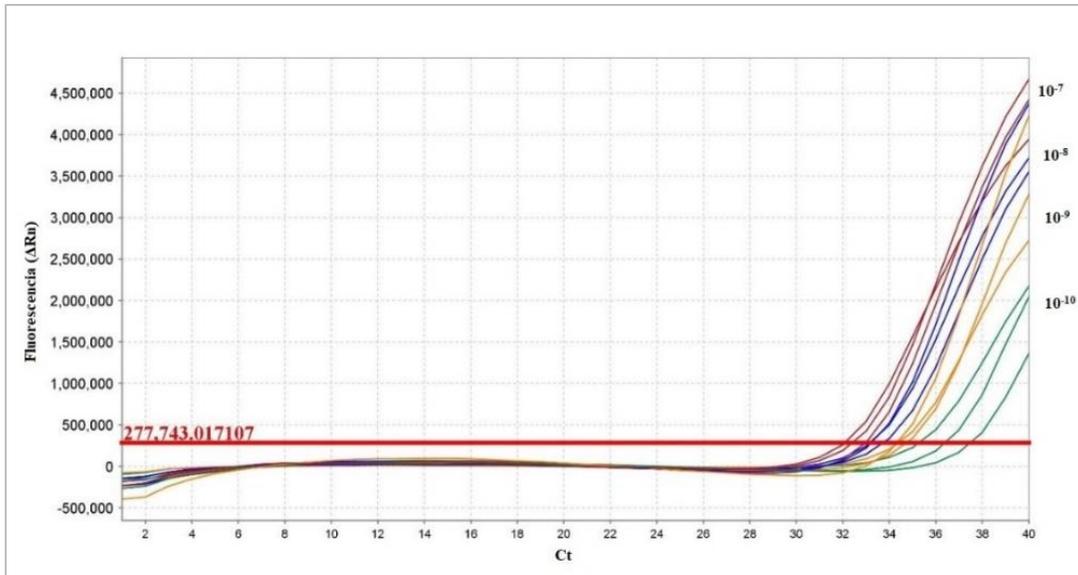


Figura 6. Curva de amplificación para el límite de detección mediante qPCR de las diluciones seriadas de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} del ADN genómico de la cepa vacunal SG 9R.

4.5. Análisis de reproducibilidad y repetibilidad

Se obtuvo un 100 % de repetibilidad para la PCR punto final al comparar las réplicas dentro del mismo ensayo. Estudios como los de Díaz de la Osa et al. (2015) reportan el mismo resultado durante la estandarización de una PCR punto final para la detección de potyvirus. Para el análisis de reproducibilidad del presente trabajo se obtuvo un valor de Kappa de $K= 0.98$ lo cual corresponde a un grado de concordancia “excelente” (cuadro 5).

Al aplicar la prueba estadística de Mc Nemar se obtuvo un $X^2_{Mc}= 1.00$ y al realizar la comparación con el valor Chi $X_{chi} = 3.84$ se obtiene que $X^2_{Mc} < X_{chi}$ por lo tanto, se acepta la hipótesis Nula (H_0) y se establece que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del Laboratorio 1 y el Laboratorio 2. Autores como Lavalett et al. (2009) obtuvieron un valor de $K= 0.95$ para la detección de *Salmonella enterica*, con el cual establecieron que los resultados de la prueba son reproducibles. Dicho valor es cercano al obtenido en el presente estudio, por lo tanto, es posible afirmar la reproducibilidad de la PCR punto final.

Cuadro 5. Resultados de la tabla de contingencia 2X2

	Laboratorio 2		Total
Laboratorio 1	59	0	59
	1	40	41
Total	60	40	100

Para la qPCR en el ensayo intra-laboratorio se logró evidenciar una elevada repetibilidad debido a los valores bajos (≤ 0.102) que se obtuvieron para la DS y % CV (≤ 0.673) entre cada una de las réplicas (Cuadro 6). De igual manera, los resultados obtenidos para el análisis inter-laboratorio se mantuvieron entre 0.285 a 1.088 para la DS y 1.225 a 5.904 en el caso del % CV, demostrando una alta reproducibilidad de la prueba al realizar la comparación entre ambos laboratorios (Cuadro 7). Debido a que el coeficiente de variación (CV) corresponde a la dispersión de los datos con respecto a la media calculada (Kralik y Ricchi, 2017) es posible emplearlo para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de un ensayo, ya que entre más bajo sea el % CV menor será la variabilidad entre los datos.

Dicho lo anterior, los coeficientes de variación obtenidos tanto intra-laboratorio como inter-laboratorio para la qPCR concuerdan con los de otros autores (Ebentier et al., 2013; García, 2019). Estos reportaron valores de CV menores al 6 % los cuales indican una elevada repetibilidad y reproducibilidad de la prueba, reflejando la robustez y la fiabilidad de esta para producir el mismo resultado en diferentes ensayos.

Cuadro 6. Ensayo intra-laboratorio de la qPCR

Muestra (ng/μL)	Promedio Ct (n=3)^a	DS^b	CV (%)^c
20	14.407 \pm 0.020	0.035	0.244
4	16.400 \pm 0.050	0.087	0.532
0.8	19.197 \pm 0.012	0.021	0.108
0.16	22.280 \pm 0.086	0.150	0.673
0.032	23.057 \pm 0.058	0.102	0.443
0.0064	24.907 \pm 0.044	0.076	0.307

^a Valores de la media de Ct \pm error estándar de la media para las 3 réplicas (n=3).

^b y ^c desviación Estándar y porcentaje del Coeficiente de Variación.

Cuadro 7. Ensayo inter-laboratorio de la qPCR

Muestra (ng/ μ L)	Promedio Ct ^a		DS ^b	CV (%) ^c
	SENASA	LBP		
20	13.680 \pm 0.156	14.407 \pm 0.020	0.514	3.657
4	15.373 \pm 0.161	16.400 \pm 0.050	0.726	4.571
0.8	17.658 \pm 0.069	19.197 \pm 0.012	1.088	5.904
0.16	21.493 \pm 0.017	22.280 \pm 0.086	0.557	2.544
0.032	23.460 \pm 0.132	23.057 \pm 0.058	0.285	1.225
0.0064	25.775 \pm 0.046	24.907 \pm 0.044	0.614	2.422

^a Valores de la media de Ct \pm error estándar de la media para las 3 réplicas (n=3).

^b y ^c desviación Estándar y porcentaje del Coeficiente de Variación.

4.6 Detección de *S. Gallinarum/Pullorum* en tejidos biológicos

En los cultivos de los tejidos positivos para *S. Gallinarum/Pullorum* se observaron muy pocas colonias del patógeno de interés. En el caso del cultivo correspondiente a la médula ósea no se obtuvo ninguna colonia (Anexo 7). Además, se evidenció el crecimiento de *E. coli* en dos de las placas. A pesar de la baja presencia de *S. Gallinarum* en los cultivos en placa y el crecimiento de otros patógenos, al realizar la PCR punto final directamente de los tejidos biológicos se lograron obtener bandas positivas para cada uno de los tejidos bajo estudio (Figura 8).

El crecimiento reducido de las colonias se puede deber a que las muestras fueron almacenadas durante un período de tiempo prolongado (1 año) y, además, fueron sometidas a procesos de congelación y descongelación sin el uso de un agente crioprotector. Lo anterior puede ocasionar una reducción en la viabilidad celular mediante la ruptura de la membrana plasmática causada por la formación de cristales durante el proceso de congelación o al producir un choque osmótico cuando se descongela (Pegg, 2015). Sin embargo, los resultados de la PCR demostraron que no es necesario realizar una incubación previa en un medio nutritivo tal como Tripticasa soya o llevar a cabo un aislamiento del patógeno para lograr amplificar la secuencia de interés. Tal resultado es de suma importancia para el diagnóstico rápido, previo al aislamiento y cultivo del patógeno, en muestras obtenidas directamente de campo.

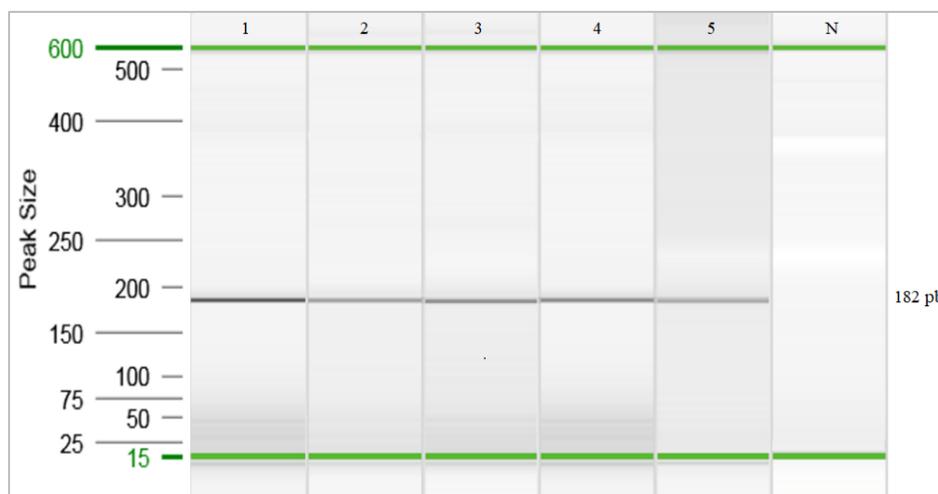


Figura 7. Electroforesis capilar de las muestras de tejido biológico. (1) Control positivo (cepa SG 9R); (2 y 3) Hígado; (4 y 5) Médula ósea; (N) control negativo (agua grado PCR)

5. Conclusiones

En el presente trabajo se optimizaron dos métodos sensibles, seguros y precisos de PCR para la detección de *S. Gallinarum/Pullorum* en aislamientos bacterianos obtenidos a partir de aves de corral.

Las técnicas empleadas permiten una detección más rápida de *S. Gallinarum/Pullorum* al compararlas con las pruebas microbiológicas tradicionales, lo cual aporta una herramienta útil para disminuir el tiempo de espera para tomar acción en casos de sospecha clínica y posibles brotes.

Mediante la secuenciación y posterior análisis filogenético de los productos de PCR se corrobora la amplificación exitosa del gen *flhB* correspondiente a *S. Gallinarum/Pullorum*, comprobando la especificidad de la técnica con los cebadores empleados.

La PCR punto final tuvo un límite de detección de células viables de 3×10^2 UFC/mL y 6.4 pg/ μ L de ADN. Mientras que, la qPCR logró detectar 10 copias de ADN por reacción. Por lo tanto, ambas técnicas son capaces de detectar concentraciones muy bajas de *S. Gallinarum/Pullorum*.

El cambio en las condiciones y en equipos de laboratorio no afecta los resultados de las técnicas de PCR ejecutadas, por lo tanto, se demuestra la consistencia del método en producir los mismos resultados.

Aun en presencia de otros patógenos en las muestras de tejidos biológicos es posible detectar *S. Gallinarum/Pullorum*, demostrando así la selectividad y aplicabilidad de la prueba.

6. Recomendaciones

Evaluar otros métodos de extracción que no se basen en columnas con el fin de disminuir la contaminación por alcoholes u otras sustancias como la guanidina, o llevar a cabo un paso adicional de purificación del ADN extraído que elimine estos contaminantes.

Utilizar un mayor número de muestras de tejido biológico o mayor variedad de serotipos de *S. Gallinarum* que hayan sido reportados en aves de corral para así lograr definir con mayor exactitud la exclusividad y selectividad de la prueba.

En caso de nuevos brotes de *S. Gallinarum/Pullorum* almacenar muestras de tejido biológico para poder incorporarlos en el análisis de aplicabilidad de la PCR. Procurar un almacenamiento de estos a -80 °C junto con un agente crioprotector para lograr preservar el ADN durante mayor tiempo y evitar su posible degradación.

Emplear cebadores que permitan diferenciar entre los biotipos Gallinarum y Pullorum con el fin de conocer la prevalencia de cada uno de estos en el país y utilizar este conocimiento para contribuir en el control y prevención de las enfermedades que estos ocasionan.

Llevar a cabo más estudios que promuevan el uso de técnicas moleculares novedosas y alternativas tales como la Secuenciación de Próxima Generación (NGS), el Análisis de Alta Resolución de la Temperatura de Fusión (HRM) o la epidemiología molecular que se puedan emplear en el diagnóstico de brotes masivos, aportando información relevante para la vigilancia de diversas enfermedades.

7. Referencias

- Álvarez, O., Larigauderie, G., Ortega García, M., Granja Albarellos, C., y Cabria Ramos, J. C. (2018). Optimización y Validación de una PCR en Tiempo Real para la Rápida Identificación de *Bacillus thuringiensis*, Simulador de *Bacillus anthracis*. *Sanidad Militar*, 74(2), 84-89.
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*.
<https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Arora, D., Kumar, S., Jindal, N., Narang, G., Kapoor, P. K., & Mahajan, N. K. (2015). Prevalence and epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum from poultry in some parts of Haryana, India. *Veterinary World*, 8(11), 1300–1304.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1300-1304>
- Barrow, P. A., & Freitas-Neto, O. C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: A review. *Avian Pathology*, 40(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>
- Batista, D. F. A., de Freitas Neto, O. C., Lopes, P. D., de Almeida, A. M., Barrow, P. A., & Berchieri, A. (2013). Polymerase chain reaction assay based on *ratA* gene allows differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(2), 259–262.
<https://doi.org/10.1177/1040638713479361>
- Bevan, I. S., Rapley, R., & Walker, M. R. (1992). Sequencing of PCR- amplified DNA. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1, 222–228. <https://doi.org/10.1101/gr.1.4.222>
- Braun, S. D., & Methner, U. (2011). Comparison of DNA isolation methods and detection of *Salmonella* spp. from animal faeces and dust using *invA* real- time PCR. *Berliner Und*

Munchener Tierärztliche Wochenschrift, 124(5–6), 177–185.
<https://doi.org/10.2376/0005-9366-124-177>

Bumsteada, N., & Barrowa, P. (1993). Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. enteritidis* in Inbred Lines of Chickens. *American Association of Avian Pathologists*, 37(1), 189–193.

Bustin, S. A. (2017). How to speed up the polymerase chain reaction. *Biomolecular Detection and Quantification*, 12 (1), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.05.002>.

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution*, 17(4), 540–552.

Celis-Estupiñan, A., Batista, D. F. A., Cardozo, M. V., Secundo de Souza, A. I., Rodrigues Alves, L. B., Maria de Almeida, A., Barrow, P. A., Junior, A. B y Caetano de Freitas Neto, O. (2017). Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. *Avian Pathology*, 46(4), 416–425. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1299922>

Chen, Y., Ye, W., Zhang, Y., & Xu, Y. (2015). High speed BLASTN: An accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Research*, 43(16), 7762–7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>

Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. <https://doi.org/10.1157/13059826>

Dalai, N., Shekhar, S., Padhy, A., Praveen, P, K., & Sahu, A, R. (2015). Salmonellosis - a Potential Threat To Poultry: *Journal of Cell and Tissue Research*, 15(3), 5209–5213.

Decreto Ejecutivo N° 34669-MAG (2008, 13 de Agosto). Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria El presidente de la Republica y el ministro de Agricultura y Ganadería. Publicado en la Gaceta N°156. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?nValor1=1&nValor2=63731

Derksen, T., Lampron, R., Hauck, R., Pitesky, M., & Gallardo, R. A. (2018). Biosecurity Assessment and Seroprevalence of Respiratory Diseases in Backyard Poultry Flocks Located Close to and Far from Commercial Premises. *Avian Diseases*, 62(1), 1–5. <https://doi.org/10.1637/11672-050917-Reg.1>

Díaz, G., Rosadio, R., Marcelo, G., Chero, A., Jiménez, Ar., Reyna, I., y Maturrano, L. (2017). Evaluación de una Técnica de PCR-Múltiple para la Detección Rápida de Salmonella Typhimurium y Enteritidis en Cuyes (*Cavia porcellus*) Naturalmente Infectados. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 713–722. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13361>

Ebentier, D. L., Hanley, K. T., Cao, Y., Badgley, B. D., Boehm, A. B., Ervin, J. S., ... Jay, J. A. (2013). Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of qPCR-based microbial source tracking methods. *Water Research*, 47(18), 6839–6848. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.060>

Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

Foley, S. L., Johnson, T. J., Nayak, R., Ricke, S. C., & Danzeisen, J. (2013). Salmonella Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), 582–607. <https://doi.org/10.1128/mubr.00015-13>

- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). Real-Time PCR. In *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>
- Freitas, N., Penha, F., Barrow, P., & Berchieri, A. (2010). Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, *12*(1), 01-11. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2010000100001>
- García, R. (2019). Validación de una metodología para la cuantificación de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus acidophilus* La3) en yogur [Tesis de maestría, Universidad de Antioquia, Colombia]. Archivo digital. <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/11259>
- Law, J. W. F., Mutalib, N. S. A., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, *5*(1), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
- Gwida, M. M., & Al-Ashmawy, M. A. M. (2014). Culture versus PCR for salmonella species identification in some dairy products and dairy handlers with special concern to its zoonotic importance. *Veterinary Medicine International*, *1*. <https://doi.org/10.1155/2014/502370>
- Heymans, R., Vila, A., van Heerwaarden, C. A. M., Jansen, C. C. C., Castelijin, G. A. A., van der Voort, M., & Biesta-Peters, E. G. (2018). Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLOS ONE*, *13*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206316>
- Huberman, Y. & Terzolo, H. R. (2014). Tifosis aviar. Engormix. Animal Production Department, Bacteriology, Argentina. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/tifosis-aviar-t31420.htm>

- Iqbal, M. N., Rasheed, M. A., Awais, M., Chammam, W., Kanwal, S., Khan, S. U., Saddick, S., Tlili, I. (2020). BMT: Bioinformatics mini toolbox for comprehensive DNA and protein analysis. *Genomics*, 112(6), 4561–4566. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.08.010>
- Kang, T. S. (2019). Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 91(1), 574–585. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.037>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14(6), 587-589.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Łaniewski, P., Mitra, A., Karaca, K., Khan, A., Prasad, R., Curtiss, R., & Roland, K. L. (2014). Evaluation of protective efficacy of live attenuated salmonella enterica serovar gallinarum vaccine strains against fowl typhoid in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(9), 1267–1276. <https://doi.org/10.1128/CVI.00310-14>
- Lavalett, L., Sánchez, M. M., Muñoz, N., Moreno, J., y 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(1), 244–52244.

- Lee, Y. J., Mo, I. P., & Kang, M. S. (2005). Safety and efficacy of Salmonella gallinarum 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathology*, 34(4), 362–366. <https://doi.org/10.1080/03079450500180895>
- Liu, Y., Zhang, D. F., Zhou, X., Xu, L., Zhang, L., & Shi, X. (2017). Comprehensive analysis reveals two distinct evolution patterns of Salmonella flagellin gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02604>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Miller, M., Barrett, S., & Henderson, D. A. (2009). Chapter 62: Control and Eradication. *Disease Control Priorities in Developing Countries (2nd Edition)*, 1163–1176. <https://doi.org/10.1596/978-0-8213-6179-5/chpt-62>
- Minh B.Q., Nguyen M.A.T., and von Haeseler A. (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 30 (1),1188-1195.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268-274
- Nurjanah, S., Rahayu, W. P., & Mutaqin, L. Al. (2018). Detection Method for Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Engineering & Technology*, 7(March), 302–306. <https://doi.org/10.1128/AEM.00644-17>

- OIE Terrestrial Manual (2018a). Development and optimization of nucleic acid detection assays, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.2.3, 195-205. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf
- OIE Terrestrial Manual (2018b). Fowl Typhoid and Pullorum disease, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.3.11, 914-930. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf
- OIE Terrestrial Manual. (2018c). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 1.1.6, 72–87. <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online>
- Olmos, A. F., Gracia de la Fuente, C., Nieto, J. S., y Ramos, S. V. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Parker, C. T., Tindall, B. J., & Garrity, G. M. (2019). International code of nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), 1–111. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>
- Parra, M., Durango, J., y Mattar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *Revista MVZ Córdoba*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.521>
- Piñeros, J., y Rodríguez, M. (2010). Identificación de Salmonella Gallinarum y Salmonella Pullorum en pollo de engorde de la Línea ROSS 308. [Tesis de Grado, Universidad de La Salle, Colombia]. Archivo digital. <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1144&context=zootecnia>

- Pegg, D. E. (2015). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. *Springer Protocols*, 1257(1), 477–488. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5>
- Rahman, M. A., Samad, M. A., Rahman, M. B., & Kabir, S. M. L. (2004). Bacterio-pathological Studies on Salmonellosis, Colibacillosis and Pasteurellosis in Natural and Experimental Infections in Chickens. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2 (1), 01–08.
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. 4(1), 30-36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.4. 2012-2014. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., & Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(3), 145–151. <https://doi.org/10.1002/jcla.20307>
- Roux, K. H. (2009). Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2 (1), <https://doi.org/10.1101/pdb.ip66>
- Rubio, M., Penha-Filho, R. C., Maria de Almeida, A & Berchieri, A. (2017). Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum*. *Avian Pathology*, 46(6), 644–651. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1339866>
- Ryan, M. P., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>

- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (2018). Informe de Gestión del Sector Agropecuario y Rural del 2014 al 2018. San José, C.R., http://www.sepsa.go.cr/docs/2018-005-Informe_Gestion_Sector_Agropecuario_2014-2018.pdf
- SENASA (2013a). Programa Nacional Salud Aviar (No. 02). Protocolo Vigilancia de Salmonella en Aves Reproductoras. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/231014045057.pdf>
- SENASA (2013b). Programa Nacional Salud Aviar: Plan de control Salmonelosis aviar en granjas de postura comercial en los distritos de Turrúcares y Piedras Negras (No. 02). <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/261113014127.pdf>
- Shivaprasad, H. L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 19(2), 405–424. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1222>
- Shivaprasad, H. L., & Barrow, P. A. (2008). Diseases of poultry: Pullorum disease and fowl typhoid, *Blackwell Publishing*, 12(1), 620-634.
- Tadele, G., Asrade, B., Bayleyegn, G., & sanni Ali, M. (2014). Sero-prevalence of Fowl Typhoid and Pullorum Disease from Apparently Healthy Chickens in Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 05(01), 10–12. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000156>
- Tahamtan, A., Charostad, J., Hoseini-Shokouh, S. J., & Barati, M. (2017). An Overview of History, Evolution, and Manufacturing of Various Generations of Vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine*. <https://doi.org/10.5812/jamm.12315>
- Terzolo H. (2011). Estudio bacteriológico de las salmonelosis de las aves (S. pullorum, S. gallinarum, S. Enteritidis y S. Typhimurium) en América Latina. Memorias del Seminario Internacional sobre Salmonelosis Aviar. Rio de Janeiro, Brasil. https://www.researchgate.net/publication/280494787_Estudio_bacteriologico_de_las_Sal

monellosis_Aviaries_S_pullorum_S_gallinarum_S_Enteritidis_S_Typhimurium_en_America_Latina_Seminario_Internacional_sobre_Salmonelosis_Aviar_UBABEF_-_ALA.

Terzolo, H. (2012). *Salmonella gallinarum*: Epidemiología, control y erradicación en las granjas avícolas. Conference: XIV Reunión del Comité Interamericano de Sanidad Avícola – CISA, At Buenos Aires, Argentina. https://www.researchgate.net/publication/281411823_Salmonella_gallinarum_Epidemiologia_control_y_erradicacion_en_las_granjas_avicolas.

Trevethan, R. (2017). Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers in Public Health*, 5 (1), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00307>

Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44(1), 232-235.

Vaidya, G., Lohman, D.J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171-180.

Váradi, L., Luo, J. L., Hibbs, D. E., Perry, J. D., Anderson, R. J., Orenge, S., & Groundwater, P. W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, 46(16), 4818–4832. <https://doi.org/10.1039/c6cs00693k>

Wigley, P. (2017). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: addressing fundamental questions in bacteriology sixty years on from the 9R vaccine. *Avian Pathology*, 46(2), 119–124. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1240866>

Xiong, D., Song, L., Geng, S., Tao, J., An, S., Pan, Z., & Jiao, X. (2016). One-Step PCR Detection of *Salmonella Pullorum/Gallinarum* Using a Novel Target: The Flagellar Biosynthesis Gene *flhB*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1863. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01863>

Xiong, D., Song, L., Pan, Z., & Jiao, X. (2018). Identification and Discrimination of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum Based on a One-Step Multiplex PCR Assay. *Frontiers in microbiology*, 9, 1718. doi:10.3389/fmicb.2018.01718

Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>

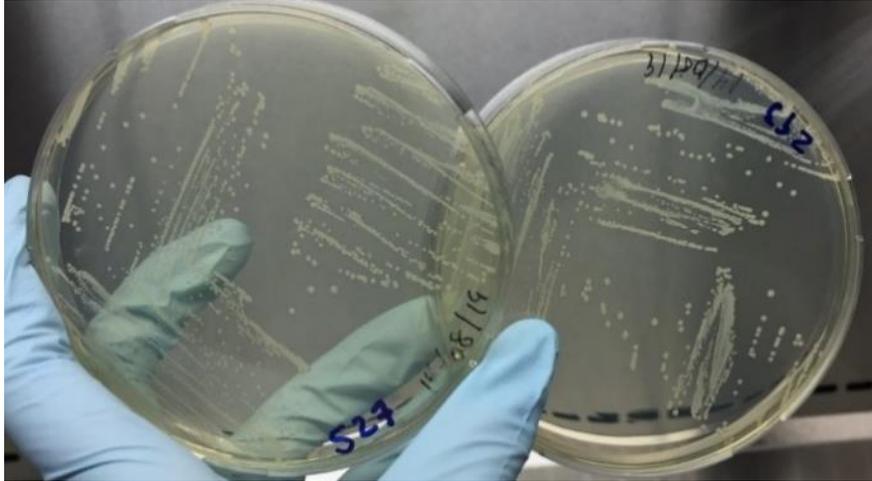
8. Anexos

Anexo 1. Especificaciones de las muestras empleadas en el estudio

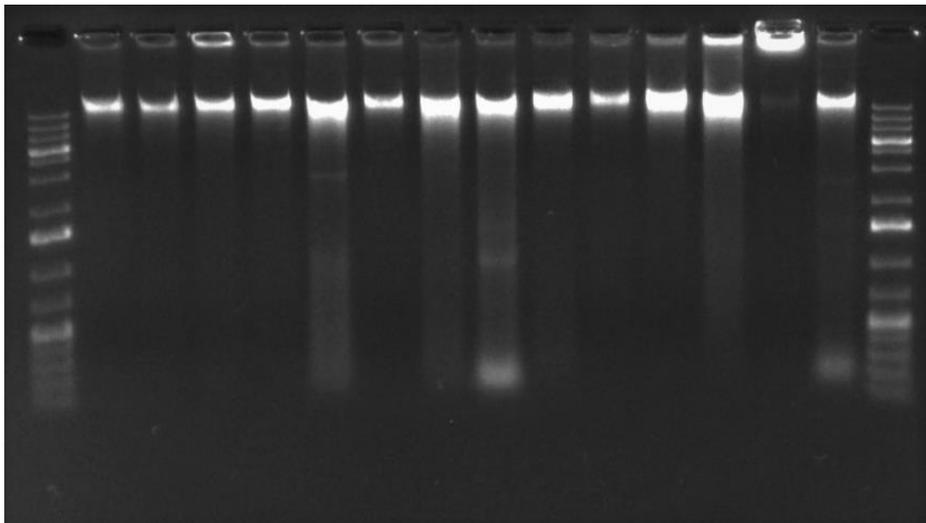
Numero de cepa	Muestra	Especie	Fuente
1	D1141-13	<i>Salmonella</i> Gallinarum	SENASA
2	D2165-13	<i>Salmonella</i> Gallinarum	SENASA
3	D3279-13	<i>Salmonella</i> Gallinarum	SENASA
4	D2158-13	<i>Salmonella</i> Gallinarum	SENASA
5	Vacunal SG 9R	<i>Salmonella</i> Gallinarum	SENASA
6	Vacunal AVIPRO	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SENASA
7	ATCC® 10708™	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	SENASA
8	ATCC® 35640™	<i>Salmonella</i> Abaetetuba	SENASA
9	ATCC® 13076™	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SENASA
10	ATCC® 14028™	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Escuela de Medicina Veterinaria UNA
11	ATCC® 13036™	<i>Salmonella</i> Pullorum	Escuela de Medicina Veterinaria UNA
12	ATCC® 25923™	<i>Staphylococcus aureus</i>	SENASA
13	ATCC® 25922™	<i>Escherichia coli</i>	SENASA
14	ATCC® 12945™	<i>Pasteurella multocida</i>	Escuela de Medicina Veterinaria UNA

Anexo 2. Datos de concentración y pureza del ADN extraído

Muestra	Concentración del ADN (ng/μL)	A_{260/280}	A_{260/230}
293	37.8	1.60	0.41
534	21.4	1.51	0.53
535	21.6	1.67	0.47
536	37.6	1.57	0.59
SG 9R	20.0	1.98	1.46
<i>Salmonella Pullorum</i>	14.0	1.66	0.45
<i>Salmonella Enteritidis</i>	46.8	1.88	0.88
<i>Salmonella Enteritidis</i> (Cepa vacunal)	23.6	1.72	0.62
<i>Salmonella Abaetetuta</i>	38.1	1.62	0.70
<i>Salmonella</i> <i>Choleraesuis</i>	31.7	1.59	0.71
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	43.2	2.04	1.72
<i>Pasteurella multocida</i>	14.9	1.86	0.83
<i>Escherichia coli</i>	26.1	1.77	0.20
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	37.3	1.36	0.55



Anexo 3. Prueba de control de calidad en placas Petri con medio tripticasa soya realizado para todas las cepas bajo estudio

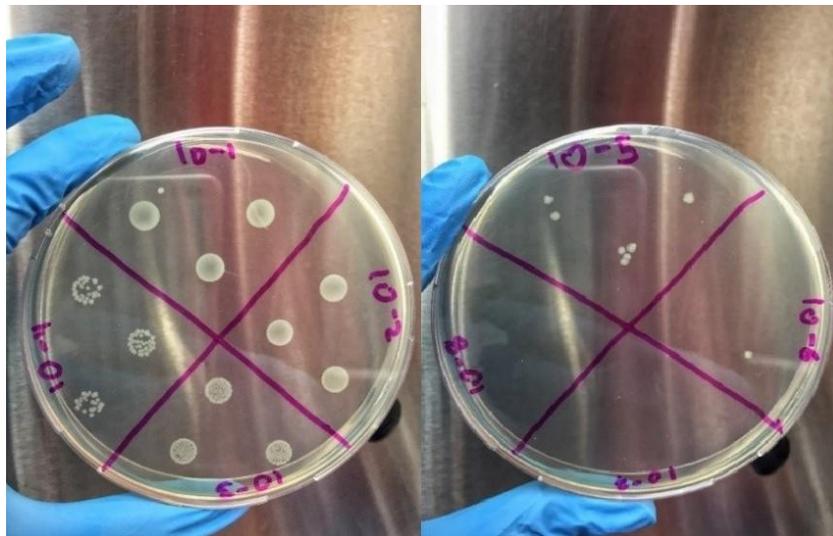


Anexo 4. Electroforesis en el de agarosa 1% para determinar la integridad del ADN extraído. De izquierda a derecha: (M) Marcador Molecular 1kb; ADN de *S. Gallinarum* cepa 1, 2, 3, 4, 5, 11; *S. Enteritidis* cepa 9, 6; *S. Abaetetuba* cepa 8; *S. Choleraesuis* cepa 7; *S. Typhimurium* cepa 10; *P. multocida* cepa 14; *S. aureus* cepa 12; *E. coli* cepa 13; (N) Control Negativo (agua grado PCR).

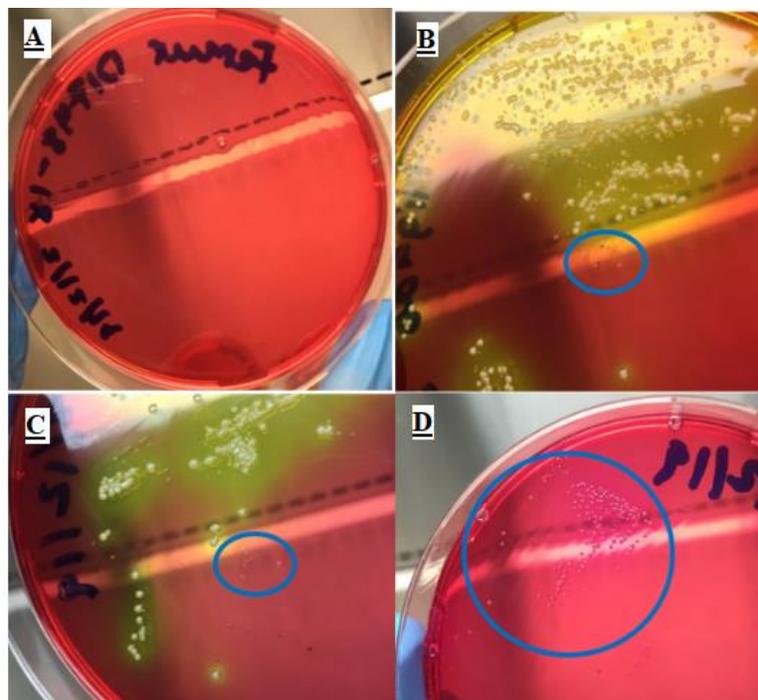
Anexo 5. Información de las secuencias utilizadas para el análisis bioinformático del fragmento del gen *flhB* (182 pb).

Especie	Serotipo	Cepa	# Accesoión GenBank	Región extraída del Genoma (posición en pb)
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-	ATCC 13047	NC_014121.1	1439040:1439426
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Enteritidis	SE74	CP050723.1	2734804-2735182
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Gallinarum	9184	CP019035.1	2949564-2949745
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Gallinarum	287/91	AM933173.1	1220990-1221171
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Typhimurium	LT2	NC_003197.2	2846698:2847079
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Stanleyville	ARB61	CP017723.1	2030975:2031341
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Dublin	-	LK931502.1	1013219:1013584
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Pullorum	QJ-2D-Sal	CP022963.1	2871478-2871659
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Pullorum	ATCC 9120	CP012347.1	2686037-2686218
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Typhi	CMCST_CEPR_1	CP053702.1	1927865-1927980
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Infantis	CVM_N17S1509	CP052817.1	2560609-2560724
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Anatum	Sal-5091	CP045518.1	3991839-3992217

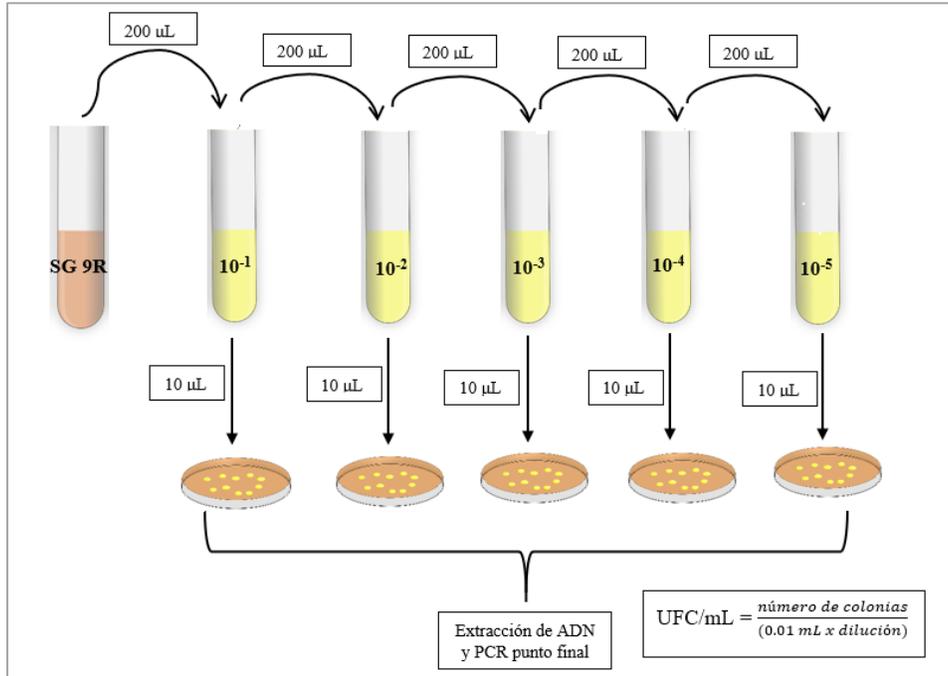
- Muestras sin información



Anexo 6. Placas Petri con medio Trypticase soya y las respectivas diluciones por triplicado de 10^{-1} hasta 10^{-8} de la cepa control (SG9R)



Anexo 7. Cultivo de las muestras de tejido y las colonias obtenidas de *S. Gallinarum* (señaladas por un círculo). Médula ósea (A), Hígado (B y C) y control positivo cepa SG9R.



Anexo 8. Esquema correspondiente a la metodología empleada para calcular el límite de detección para células bacterianas viables.