

FRECUENCIA DE *Salmonella enterica* EN AVES DE TRASPATIO DE LA LOCALIDAD DE SAN LORENZO, DEPARTAMENTO CENTRAL, REPÚBLICA DEL PARAGUAY

ALVAREZ F¹, COPEL J², ALVAREZ M³, NUÑEZ YEGROS L¹, SUZUKI K⁴, GORETTI SILVA M¹, ZARATE N³, CASTRO L¹, WEILER N³, FACCIOLI M¹, LEOTTA G^{2, 5, 6 *}

¹ Lab. de Diagnóstico de las Enfermedades de las Aves, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay, ² Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, ³ Departamento de Bacteriología y Micología, Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social de la República del Paraguay, ⁴ PROVETSUR - Agencia de Cooperación Internacional del Japón, ⁵ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ⁶ Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" CCT-La Plata CONICET-Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: La salmonelosis es la enfermedad transmitida por alimentos de origen bacteriano más importante a nivel mundial y su agente etiológico es *Salmonella enterica*. En Paraguay, es habitual la cría de aves de traspatio para consumo de huevos y carne. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de *S. enterica* en aves de traspatio de la Localidad de San Lorenzo, Departamento Central, República del Paraguay. Se recolectaron 400 muestras cloacales de aves de traspatio. La detección de *S. enterica* se realizó por PCR. Para el aislamiento se utilizó la metodología de separación inmunomagnética y la siembra en agar XLT4. Las colonias sospechosas fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas y serotipificación. Se determinó la susceptibilidad a 11 antimicrobianos. Se detectaron 25 (6,25%) muestras positivas por PCR y se aislaron 11 (2,75%) cepas de *S. enterica*: 8 *S. Enteritidis*, 2 *S. Schwarzengrund* y 1 *S. Saintpaul*. Todos los aislamientos fueron sensibles a 9 antimicrobianos probados. Sin embargo, todas las cepas de *S. Enteritidis* presentaron resistencia a ácido nalidixico y nitrofurantoina. *Salmonella Enteritidis* se encuentra entre las serovariedades más comunes que causan salmonelosis en el ser humano y es el serotipo más prevalente en casos de ETA en Paraguay. Consideramos necesario implementar medidas de intervención relacionadas con la educación de los propietarios de aves de traspatio. Este es el primer trabajo en el que se detectó, aisló y caracterizó *S. enterica* en aves de traspatio de la República del Paraguay.

Palabras clave: *Salmonella*, aves de traspatio, Paraguay.

FREQUENCY OF *Salmonella enterica* IN BACKYARD CHICKEN FROM SAN LORENZO CITY, DEPARTAMENTO CENTRAL, REPÚBLICA DEL PARAGUAY

ABSTRACT: Salmonellosis is a disease transmitted by food of more important bacterial origin worldwide. The ethiological agent is *Salmonella enterica*. In Paraguay, backyard chicken raising is common for home eggs and meat production and consumption. The aim of this work was to determine the frequency of *S. enterica* in backyard chicken at San Lorenzo, a city located in the Central Department of Paraguay. Four hundred cloacae samples of backyard chicken were collected. *S. enterica* was detected through PCR technique. The immunomagnetic separation methodology and streaked in agar XLT4 were used for *Salmonella* isolation. Suspicious colonies were characterized by biochemical tests and serotyping. Susceptibility to 11 antimicrobial agent was determined. Twenty five positive samples (6.25%) were detected by PCR and 11 strain (2.75 %) of *S. enterica* were isolated: 8 *S. Enteritidis*, 2 *S. Schwarzengrund* and 1 *S. Saintpaul*. All the isolates were sensitive to 9 antimicrobial tested. However, all *S. Enteritidis* showed resistance to nalidixic acid and nitrofurantoin. *Salmonella Enteritidis* is between the most common serovar that may cause salmonellosis in the human being. It is also the most prevailing serotype in ETA cases in Paraguay. It is necessary to implement measures related to the education of backyard chicken owners and raisers. This is the first work that detected, isolated and characterized *S. enterica* in backyard chickens in Paraguay

Key words: *Salmonella*, backyard chicken, Paraguay.

Dirección para correspondencia: Gerardo Leotta, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: gleotta@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCION

La salmonelosis es la enfermedad transmitida por alimentos (ETA) de origen bacteriano más importante a nivel mundial. En los países de Latinoamérica los rangos de prevalencia varían entre 200 y 500 casos cada 100.000 habitantes (1). En Paraguay, la salmonelosis es una de las primeras causas de enfermedades transmitidas por alimentos.

El principal agente etiológico de esta enfermedad es *Salmonella enterica*. Su clasificación taxonómica es muy compleja, actualmente se reconocen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La primera de ellas incluye seis subespecies que agrupan 2443 serotipos: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (2). Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se los encuentra como comensales y patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos (3). Los alimentos involucrados en brotes de ETA causados por *Salmonella* son huevos, ovoproductos, carnes y derivados, productos lácteos, alimentos a base de cremas, vegetales y panificados.

En Paraguay, la cría de aves de traspatio para consumo familiar de huevos y carne es habitual. Por lo tanto, se debe considerar a estas aves como un potencial reservorio de *S. enterica* y por ende una potencial fuente de infección para el ser humano.

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de *S. enterica* en aves de traspatio de la Localidad de San Lorenzo, Departamento Central, República del Paraguay.

MATERIALES Y METODOS

Entre el 31 de marzo y el 9 de abril de 2009, se recolectaron muestras cloacales de 400 aves de traspatio. Las aves fueron criadas por 48 propietarios en 25 de los 52 barrios de la Localidad de San Lorenzo. Se recolectaron 16 muestras por cada barrio y 8 muestras por cada propietario. Las muestras se obtuvieron a partir de hisopados cloacales y se conservaron en tubos con agua peptonada (Acumedia, Michigan, EE.UU.). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 20 h y luego cada muestra fue analizada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *S. enterica*. Para ello, se extrajo ADN a 1 ml de cada pre-enriquecimiento. Se utilizaron oligonucleótidos específicos (Invitrogen, Brasil) para la detección del gen *invA* S139 y S141 (4). El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 µl, y consistió en 2,5 µl de buffer de PCR 10X (500 mM KCl, 200 mM Tris HCl), 1,25 µl de dNTPs (10 mM), 1,6 µl de MgCl (25 mM), 0,5 µl de cada oligonucleótido (0,1 nmol/µl), 0,5 µl de *Taq* DNA polimerasa (5U/µl) (Fermentas, California, EE.UU.) y 5 µl de ADN templado obtenido de

cada muestra. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: incubación inicial a 94 °C por 60 seg, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 seg, annealing a 64 °C por 30 seg y elongación a 72 °C por 30 seg, seguido de 7 min finales de extensión a 72 °C. Los productos de ADN amplificado de las muestras analizadas fueron analizados en geles de agarosa al 1,2%, coloreados con el intercalante *sybr safe* (Invitrogen Life Technologies, Brasil) y visualizados con transiluminador de lámpara azul. Como marcador de peso molecular se utilizó Cienmarker (Biodynamics, Bs As, Argentina).

Para el aislamiento de *Salmonella* spp. se utilizó la metodología de separación inmunomagnética según las instrucciones del fabricante (Dynal, Invitrogen). Posteriormente, se sembró el inmunocentrado en agar xilosa lisina tergitol (XLT4, Acumedia), incubándose a 37°C durante 20 h. Las colonias sospechosas fueron sembradas en agar triple azúcar hierro (TSI, Acumedia) y en agar lisina decarboxilasa (LIA, Acumedia). Las colonias sospechosas fueron confirmadas por pruebas bioquímicas y serotipificación. La determinación de especie y subespecie se realizó de acuerdo con el método descrito por Poppof (5). La serotipificación fue realizada según el esquema de Kauffman-White (6) con antiseros somáticos y flagelares para *Salmonella* (Denka-Seiken, Tokyo, Japón). La susceptibilidad a los antimicrobianos se determinó por la técnica de difusión en disco según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute for Enterobacteriaceae* (7). Los antimicrobianos utilizados fueron ampicilina (AMP), amoxicilina-acido clavulánico (AMC), cefixima (CFM), cefotaxima (CTX), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CL), gentamicina (GN), nitrofurantoína (NIT), tetraciclina (TE), trimetoprima-sulfametoxazol (TXS) (Becton Dickinson BBL, MD, EE.UU.).

RESULTADOS

Se detectaron 25 (6,25 %) muestras positivas por PCR, correspondientes a 19 (39,6%) propietarios provenientes de 18 barrios. Se aislaron 11 (2,75 %) cepas de *S. enterica*, 8 (2 %) fueron identificadas como *S. Enteritidis*, 2 (0,5 %) *S. Schwarzengrund* y 1 (0,25 %) *S. Saintpaul*. Todas las cepas (N=11) fueron sensibles a 9 antimicrobianos: AMP, AMC, CFM, CTX, CIP, CL, GN, TE y TXS. Sin embargo, todas las cepas de *S. Enteritidis* fueron resistentes a NAL y NIT, hecho que coincide con los datos reportados en cepas aisladas de muestras humanas (8, 9).

El porcentaje de detección por PCR fue superior al porcentaje de aislamientos, este hecho pudo deberse a la alta sensibilidad de la técnica de tamizaje y a que el aislamiento se realizó directamente del agua peptonada utilizando partículas

inmunomagnéticas. Debemos considerar que el agua peptonada no es un medio de enriquecimiento selectivo, probablemente al utilizar una etapa de enriquecimiento en medios selectivos y temperaturas restrictivas, el porcentaje de recuperación podría ser mayor. Sin embargo, los componentes de los medios de enriquecimiento para *Salmonella* pueden afectar la unión de los anticuerpos adsorbidos a las partículas magnéticas.

Se aisló *S. Enteritidis* en un 2 % de las aves muestreadas. Si bien, *S. Schwarzengrund* y *S. Saintpaul* fueron asociadas con brotes de ETA en EE.UU. (10), *S. Enteritidis* se encuentra entre las serovariedades más comunes que causan salmonelosis en el ser humano (11) y es el serotipo más prevalente en casos de ETA en Paraguay. Este serotipo fue el más frecuente entre las aves de traspatio de San Lorenzo. Es interesante mencionar que en la mayoría de las viviendas donde se tomaron las muestras, las condiciones higiénico-sanitarias de las aves de traspatio no eran adecuadas y compartían el hábitat con diferentes especies animales (domésticas y silvestres).

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta estas observaciones y los resultados obtenidos en este trabajo, consideramos necesario implementar medidas de intervención relacionadas con la educación de los propietarios de las aves de traspatio, particularmente en el manejo sanitario de las aves, del ambiente, de los huevos y de las carcasas. De esta manera, se podrán prevenir potenciales infecciones en los consumidores.

El único dato previo sobre aves de Paraguay y *S. enterica* es un trabajo realizado sobre 255 gallinas ponedoras de tipo casero en la Localidad de Santo Domingo, Departamento Central, en el cual se comprobó que el 3,24 % de las aves analizadas presentaban anticuerpos contra *S. Gallinarum* (12). Por lo tanto, este es el primer trabajo en el que se detectó, aisló y caracterizó *S. enterica* en aves de traspatio de la República del Paraguay.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto de Desarrollo Profesional Continuo para los Veterinarios del Sur (PROVETSUR), Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).

BIBLIOGRAFIA

1. Miller IS, Hohmann EL, Pegues DA. *Salmonella* (Including *Salmonella* Typhi). In: Mandel, Douglas and Bennett, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed., Churchill Livingstone, New York; 1995; p. 2013-33

2. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol 2000; 38:2465-7.

3. Global Salm-Surv. Manual de Procedimientos. *Salmonella*: PARTE I. Aislamiento, identificación y serotipificación A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, 2003.

4. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss III R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes, 1992; 6:271-9.

5. Popoff M, Le Minor L. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovar. 8th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France. 2008.

6. Poppoff M, Bockemuhl J, McWorther-Murlin A. Supplement 1990 (n°34) to the Kauffman-White scheme. Res Microbiol (Inst Pasteur), Paris, France, 1990; 142:1029-33

7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, 2007; M100-S20, Wayne, Pa (EE.UU.).

8. Álvarez M, Zarate N, Fariña N. Vigilancia de Serovariedades de *Salmonella* spp. circulantes en Paraguay en el período 2004-2008. Memorias del VII Congreso Paraguayo de Infectología, Asunción, Paraguay, 2009.

9. Álvarez M, Zarate N, Fariña N. Vigilancia de Susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp. de origen clínico en el periodo 2004-2008. Memorias del VII Congreso Paraguayo de Infectología, Asunción, Paraguay, 2009.

10. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention 2010. <http://www.cdc.gov/Salmonella>.

11. Le Bacq F, Louwagie B, Verhaegen J. *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis: Changing epidemiology from 1973-1992. Europ J Epidemiol 1994; 10:367-71

12. Acosta Amarilla BC. Estudio de la presencia de salmonelosis en gallinas ponedoras tipo casero en la Localidad de Santo Domingo, Distrito de Capiata, Departamento Central. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNA) como requisito para la obtención del Título de Doctor en Ciencias Veterinarias. 2006.