

Re-emergencia de la *Salmonella pullorum* en ponedoras comerciales de Cochabamba, Bolivia

Re-emergence of *Salmonella pullorum* in commercial layers from Cochabamba, Bolivia

Martha Caero-Castellón^{1*} , Christian Villarroel-Dávalos¹ , Patricia Quispe-Corrales¹  y Sergio Emiro Rivera-Pirela² 

¹Asociación Departamental de Avicultores de Cochabamba (ADA Cochabamba), Centro de Investigación de Patología Aviar (CEINPA), Cochabamba, Bolivia.

²Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Maracaibo, Zulia, Venezuela. Correo electrónico: caeromarta@gmail.com

RESUMEN

En marzo de 2021, en el departamento de Cochabamba, provincia Quillacollo, Bolivia, se detectó un brote de Salmonelosis. Se trató de un lote de pollitas marrones de levante de la línea comercial H&N, edad 4 a 5 días. La mortalidad ascendió al 30 %, el resto mostraron todas signos de deshidratación, deposición de uratos en uréteres, hepatomegalia, taponamiento cloacal, esplenitis, saco vitelino de color verduzco, vesícula biliar licuefacta de color amarillo, molleja erosionada y ulcerosa. En cultivo bacteriológico de hígado, corazón y médula ósea se obtuvo exclusivamente *Salmonella* spp. (inmóvil) en regular cantidad, abundante cantidad en saco vitelino y escasa en bilis. La prueba de Acriflavina reveló presencia de cepa lisa (patógena). En algunas muestras crecieron además escasamente, *Escherichia coli* y *Proteus* spp. En incubadoras, los cultivos bacteriológicos de huevos picados o licuefactos mostraron crecimiento de *Salmonella* spp. Todas las muestras presentaron además alta contaminación con *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. A las reproductoras de las pollitas infectadas les fue aplicado el fusil sanitario en la totalidad de los lotes. Los aislamientos bacteriológicos de hígado, bazo, médula ósea, tonsilas cecales e hisopados cloacales de otras reproductoras de la misma granja, resultaron negativos a *Salmonella* spp. Sin embargo, se aisló *Salmonella* spp. (inmóvil) de hisopados del contenido cloacal de aves reproductoras muertas. Las pruebas bioquímicas de Glucosa, Lisina descarboxilasa, Indol, Ornitina descarboxilasa y Manitol resultaron positivas con producción de ácido y gas. Se analizaron las muestras de ADN aisladas de varios casos positivos con PCR multiplex, confirmando la presencia de *Salmonella enterica* biovar Pullorum en un laboratorio oficial dependiente del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria "SENASAG", Cochabamba, Bolivia, con lo cual queda oficialmente confirmado la presencia de *Salmonella enterica* biovar Pullorum.

Palabras clave: *Salmonella pullorum*; tifoidea; PCR multiplex; bioquímica; línea H&M

ABSTRACT

In March 2021, a *Salmonella* outbreak was detected in the Quillacollo Province from the Cochabamba Department, Bolivia. It occurred in 5-day-old commercial layers from the H&N (Brown Nick) line. The Mortality climbed to 30 %, the rest of the birds had dehydration signs, urate deposition in ureters, hepatomegaly, cloacal clothing, enlarged spleen, greenish vitelline sac, yellowish bile bladder content and gizzard erosions. At the laboratory only *Salmonella* spp. (non-movil) was detected from liver, heart, bone marrow (medium amount), higher concentrations were obtained from vitelline sac, while small amounts were detected from bile. The acriflavin test revealed the presence of a smooth *Salmonella* (pathogenic). In some cases, small amounts of *Escherichia coli* and *Proteus* spp. were concurrently detected. At the hatchery, the analysis of pipped and rotten eggs also yielded *Salmonella* spp. All the hatchery samples showed high levels of contamination with *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. The breeders of the contaminated chicks were eliminated. While the bacteriological analysis from samples (liver, spleen, bone marrow, cecal tonsils, cloacal swabs) obtained from other breeder flocks in the same farm were negative to *Salmonella* spp. Nevertheless, positive results could be obtained from dead breeders' cloacal swabs regardless of the flock. Biochemistry tests (Glucose, Lysine descarboxilase, indol, Ornityn descarboxilase and Manitol) resulted positive with acid and gas production. DNA samples were analyzed from several positive samples using a multiplex PCR at the National Diagnostic Service Department (SENASAG) in Cochabamba, Bolivia, confirming the presence of *Salmonella enterica* biovar Pullorum.

Key words: *Salmonella pullorum*; typhoid; PCR multiplex; biochemistry; H&M line

INTRODUCCIÓN

La infección por *Salmonella* aviar puede ocurrir en aves de corral de forma aguda o crónica por uno o más miembros del género *Salmonella*, familia Enterobacteriaceae. Las dos principales enfermedades bacterianas que ocurren en las aves de corral a través del género *Salmonella* son la fiebre tifoidea aviar y la Pullorosis, que es causada por *S. gallinarum* y *S. pullorum*, respectivamente. De varios serotipos de *Salmonella*, solo alrededor del 10 % de éstos se han aislado de aves de corral. Además del pollo (*Gallus gallus domesticus*), también se han informado infecciones por *S. gallinarum* y *S. pullorum* en pavos (*Meleagris gallopavo*), gallinas de Guinea (*Numida meleagris*), codornices (*Coturnix coturnix*) y faisanes (*Phasianus colchicus*) [2].

Pulido-Landínez [15] señaló que, todas las intervenciones en granjas de reproductoras, criaderos, fábricas de pienso y granjas de pollos de engorde relacionadas con el control de *Salmonella* jugarán un papel crucial en el control y, las intervenciones establecidas en cada etapa de la integración vertical contribuirán a la reducción de la presencia no deseada de *Salmonella* en el producto final y lotes sub-siguientes. El control ambiental y la bioseguridad juegan un papel clave, ya que los aislamientos de patógenos que a menudo se encuentran en las aves alojadas, ingresan a las granjas no a través de los criaderos sino a través del medio ambiente y fómites [19].

La Pullorosis es una enfermedad de distribución mundial. Se considera erradicada de la producción avícola en muchos países desarrollados como Europa Occidental, Estados Unidos de América, Canadá, Australia y Japón, donde se llevan a cabo programas de control y prevención de forma continua y rigurosa. Los informes de Pullorosis, con pérdidas significativas para las aves de corral son más comunes en países en desarrollo como México, América Latina, Medio Oriente, India y África [8]. Los pollos y pavos recién nacidos con enfermedad sistémica y portadores son las principales fuentes de infección. *S. pullorum*, a pesar de ser más específico de pollos y pavos, puede albergar otras aves como, gansos (*Anser anser*), faisanes-codornices (Phasianidae), loros (Psittacoidea), gorriones (*Passer domesticus*) y canarios (*Serinus canaria*). Sin embargo, los pollos son hospedadores naturales del agente etiológico. Además, Wei y col. [23] citan que, las aves silvestres y migratorias pueden ser reservorios de *Salmonella* patógena y resistente, siendo un gran riesgo para las aves alojadas en granjas, así como para la salud pública.

Salmonella pullorum se transmite de animales infectados a nuevos hospedadores, a través de las heces contaminadas, que se esparcen en los criaderos de aves contaminando así el medio ambiente. La sangre, los órganos, los cadáveres, las conchas y los fragmentos de huevos infectados en las incubadoras también son la vía de eliminación del agente. Los pollitos después de la eclosión nacen húmedos, y este líquido presente al nacer también puede contener el agente. La Pullorosis aviar o diarrea blanca es específica de las aves afectando principalmente individuos jóvenes, con más morbilidad que mortalidad y producida por la *S. pullorum*, responsable del estado de portador debido a sus características individuales, constituyendo un grave problema económico para la producción avícola en países donde las medidas de control no son eficientes. Produce una sintomatología menos dramática que la fiebre tifoidea y se caracteriza principalmente por diarreas blanquecinas, abdomen inflamado y retardo en el crecimiento. Causa una infección sistémica con hepato-esplenomegalia y lesiones puntuales blanquecinas en hígado y bazo, en ambos sexos. Infecta los huevos, por lo cual los embriones nacen infectados internamente en sus sacos vitelinos.

En su forma aguda, la Pullorosis es una enfermedad prácticamente exclusiva de los polluelos y el agente se puede recuperar a partir de casi todos los órganos, los tejidos y las heces. En las aves mayores, que también llegan a ser portadoras, la *S. pullorum* se aísla sobre todo a partir de los óvulos y del oviducto y sólo ocasionalmente de otros órganos y tejidos, incluyendo el tracto digestivo [1, 21].

Durante los últimos años (a) ha habido una explosión de información genética e inmunológica sobre la biología de estos microorganismos, empezando a contribuir a una mejor comprensión del agente y su interacción con el hospedador. Varias características distinguen claramente *S. enterica* serovar *pullorum* de las otras *Salmonellas*. La más llamativa es la disposición extraordinaria del séptimo fragmento I-Ceul. Esta disposición especial del séptimo fragmento I-Ceul vistos en la cepa RKS5078 representa el tipo dominante del genoma de *S. enterica* serovar *Pullorum*. La mayoría de las cepas de *S. enterica* serovar *Pullorum* toman esta estructura particular del genoma [9, 12, 16].

Las pruebas de diagnóstico serológico para *S. pullorum* generalmente son descartadas por el uso de vacunas vivas e inactivadas contra *S. gallinarum*, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. La vacuna viva con *S. gallinarum* (9R) y las vacunas inactivadas, interfieren con la interpretación de las pruebas serológicas anti-*pullorum*, por lo tanto, el control debe hacerse en aves no vacunadas, pero de manera obligatoria. La eliminación de la prueba de *Pullorum* aumenta el riesgo de ignorar la presencia solapada de aves infectadas con Pullorosis, favoreciendo su permanencia y diseminación en las granjas [16].

Los datos oficiales sobre prevalencia de infecciones por Salmonelosis aviar en Venezuela son escasos; sin embargo, en el año 2011, el INSAI (Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral de Venezuela) presentó cifras que indican la presencia de la infección en la población avícola, distribuidas en gran parte del territorio nacional, identificando no solo *S. gallinarum* y *S. pullorum*, sino también *Salmonellas* spp., de los grupos B y C (FIG. 1) [16].

En México, no hay presencia de Pullorosis desde hace menos de tres décadas, y el último brote de tifosis aviar se presentó de manera aislada en aves de traspatio en noviembre de 2015. En este último

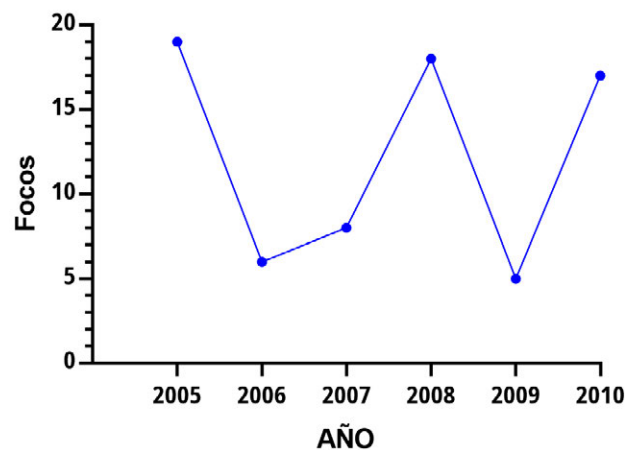


Figura 1. Focos de Salmonelosis Aviar en la República Bolivariana de Venezuela 2005-2010. Adaptado de Rivera-Pirela, S. 2018

evento, se registró un caso de tifosis en 280 aves, las cuales fueron eliminadas como parte de las medidas zoonositarias impuestas, además de las de bioseguridad pertinentes. Actualmente ambas enfermedades se encuentran en el grupo 1 del Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos, las enfermedades, plagas exóticas y endémicas, de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos, inexistentes en el territorio nacional o que han sido erradicadas del país y que, por su rápida diseminación y afectación al sector y riesgo para la salud pública, son consideradas de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de salud animal y sanidad acuícola del país [17].

Rivera [16] declaró a la *S. pullorum* como un “enemigo silencioso” debido a sus múltiples características diferenciales con el resto de las *Salmonellas*, inclusive la *S. gallinarum* y sobre todo el establecimiento de un estado de portador. Preferencialmente ataca aves jóvenes provenientes de huevos infectados desde las Reproductoras. Es clave la ausencia de inflamación gastrointestinal posterior a la infección con *S. pullorum*. Su respuesta inmunitaria tipo humoral, TH2 con elevada producción de IL-4, facilita su permanencia en macrófagos de manera casi indefinida y su seguro pase al ovario y oviducto para contaminar huevos fértiles que darán origen a huevos embrionados en la incubación. El estado de Portador de la *S. pullorum* forma parte de un sofisticado mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria exclusivo de esta especie de *Salmonella*. El genoma de la *S. pullorum* es único y exclusivo, aún se encuentra en estudio y no se conoce en su totalidad, lo cual ha impedido la elaboración de vacunas comerciales efectivas. Las granjas positivas a *S. pullorum* deberían ser declaradas en cuarentena, eliminar todos los semovientes y repobladas, posterior a una exhaustiva limpieza y desinfección con aves provenientes de zonas libres de *Salmonella*.

El método de referencia utilizado para el diagnóstico de *S. gallinarum* y *S. pullorum* durante los brotes es el cultivo microbiológico para el aislamiento, la identificación bioquímica y la serotipificación del aislado [10, 18]. Los organismos son bacilos gramnegativos, no esporulados de 1,0-2,5 micrometros (µm) de longitud y 0,3-1,5 µm de anchura. Se consideran inmóviles en condiciones normales y anaeróbicos facultativos. Puede ser aislada de sangre, buche, hígado, bazo, corazón, pulmones, ciego, saco vitelino y órganos reproductivos de pollitas, ponedoras y reproductoras adultas posterior a la infección [5]. Puede crecer en medios bacteriológicos selectivos y no selectivos, tales como MacConkey, Verde brillante y agar Desoxicolato de Xilosa-Lisina (XLD Agar-Xylose-Lysine Deoxycholate Agar). Las colonias en agar sangre o nutritivos son pequeñas (1-2 milímetros (mm) de diámetro), circulares, relucientes, lisas, ligeramente elevadas, entre 24 a 48 horas (h) de incubación. *S. pullorum* crece más lentamente que *S. gallinarum* [20].

Las diferentes especies de *Salmonella* no fermentan la lactosa ni la sucrosa pero si la dextrosa y el manitol, produciendo ácido y gas, *S. pullorum* produce ácido y gas mientras que *S. gallinarum* produce solo ácido. Todos los aislados son Indol negativos, Rojo de metilo positivos y Voges Proskauer negativos, características exclusivas de las *Salmonella* spp.

Los medios de agar triple azúcar-hierro (TSI); agar lisina-hierro (o medio de descarboxilación de l-lisina); agar urea de Christensen; medio triptona/triptófano para la reacción del indol; medio con glucosa y una campana de Durham para detectar la producción de ácido y gas; medio con dulcitol, medio con maltosa, medio de descarboxilación de ornitina y medio semisólido para comprobar la

movilidad, disciernen entre *S. pullorum*, *S. gallinarum* y otras especies de *Salmonella* spp. (TABLA I).

Además de los métodos directos utilizados para aislar estas bacterias, los métodos indirectos son importantes para los estudios epidemiológicos y el seguimiento de las condiciones sanitarias en las parvadas. Las pruebas serológicas como ELISA y la prueba rápida de seroaglutinación pueden detectar anticuerpos contra *Salmonella* spp. [3].

La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es capaz de detectar e identificar el ácido desoxirribonucleico (ADN) del patógeno. Se han desarrollado pruebas moleculares con técnicas de ribotipificación en laboratorios de investigación y se pueden utilizar para la confirmación y la diferenciación entre *S. gallinarum* y *S. pullorum* [7]. Von Hertwig y col. [22] desarrollaron una PCR multiplex en tiempo real para detectar y diferenciar específicamente las biovariedades *S. gallinarum* y *S. pullorum* estrechamente relacionadas y cuantificar simultáneamente el número de bacterias en las muestras.

Se describe en esta oportunidad un brote de *S. pullorum* en un lote de pollitas de levante de ponedoras comerciales de la línea H&N, en el departamento de Cochabamba, Bolivia, a principios del año 2021.

TABLA I
Investigación Bioquímica para *Salmonella pullorum*
y *Salmonella gallinarum*

| Ensayo Bioquímico | <i>S. pullorum</i> | <i>S. gallinarum</i> |
|---|--------------------|----------------------|
| TSI Glucosa (producción de ácido) | + | + |
| TSI Glucosa (producción de gas) | V | - |
| TSI Lactosa | - | - |
| TSI Sacarosa | - | - |
| TSI Sulfuro de Hidrógeno | V | V |
| Gas a partir de Glucosa (medio con campana de Durham) | + | - |
| Hidrólisis de Urea | - | - |
| Descarboxilación de Lisina | + | + |
| Descarboxilación de Ornitina | + | - |
| Fermentación de Maltosa | - o más tarde + | + |
| Dulcitol | - | + |
| Movilidad | - | - |

TSI: Agar Triple Azúcar Hierro; +: reacción positiva del 90 % o más en 1 o 2 días; -: reacción negativa (90 % o más); V: reacción variable. Fuente: OIE. 2021

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se trata de un lote de levante de 27.000 pollitas, línea: H&N, edad: 4 a 5 días de granjas ubicadas en el departamento Cochabamba, provincia Quillacollo, Bolivia, situadas en [17°23' 39"S](#) [166°16' 21"O](#), con síntomas de Salmonelosis, a los cuales se les practicó análisis anatomopatológicos (examen macroscópico), bacteriológico, pruebas bioquímicas y moleculares. Se observó una mortalidad del 30 %, el resto de las pollitas mostraron todas signos de deshidratación, deposición de uratos en uréteres, hepatomegalia, taponamiento cloacal, esplenitis, saco vitelino de color verdusco, vesícula biliar licuefacta de color amarillo, molleja erosionada y ulcerosa. Se aplicó el fusil sanitario a las 20.000 pollitas restantes. Igualmente se sacrificaron 3 lotes de 5.000 Reproductoras entre 27 y 60 semanas en producción.

Bacteriología

Con base en lo descrito en el Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) [13], se realizaron los exámenes bacteriológicos en el laboratorio CEINPA de la Asociación Departamental de Avicultores Cochabamba (ADA), Bolivia:

Medios de cultivo directo

- Tripticase Soya Agar - TSA
- Agar MacConkey - McC

Medios de cultivos selectivos

- Caldo Tetrionato Verde Brillante - TT
- Agar Verde Brillante - BGA

Medios de cultivo utilizado en identificación bioquímica

- Agar TSI (Triple Azúcar-Hierro)
- Agar Lisina Descarboxilasa
- Agar Citrato de Simmons
- Agar SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad)
- Caldo RM/VP (Rojo de Metilo / Voges Proskauer)
- Agar MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)
- Agar Manitol

Pruebas Moleculares

La prueba de PCR multiplex para *Salmonella* se realizó en LIDIVECO - UNALAB Cochabamba, laboratorio oficial dependiente del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG) [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó un brote de Salmonelosis en el departamento de Cochabamba, provincia Quillacollo, Bolivia confirmado en marzo de 2021. Se trata de un lote de pollitas de levante de la Línea H&N, edad 4 a 5 días de edad, al cual se le hizo el seguimiento en la incubadora y granjas de reproductoras. Las pruebas anatomopatológicas

(exámenes macroscópicos) y los aislamientos bacteriológicos, junto a las pruebas de Acrídina, bioquímicas y finalmente el PCR multiplex, confirman la presencia de *S. enterica* biovar Pullorum, cuyo origen parece ubicarse en las granjas reproductoras.

En el levante de pollitas, línea H&N, edad: 4 - 5 días, caso I, se efectuaron aislamientos bacterianos en hígado, corazón, médula ósea, saco vitelino y bilis a un total de 8 pollitas (FIG. 2), obteniéndose exclusivamente *Salmonella* spp. (inmóvil). La prueba de Acriflavina reveló la presencia de cepa lisa (patógena) de *Salmonella* (TABLA II).

En el caso II, correspondiente al levante de pollitas, línea H&N, edad: 5 días, en el examen bacteriológico se aisló principalmente la *Salmonella* spp. (inmóvil) para un total de 20 pollitas, en todos los órganos evaluados, acompañada de la *E. coli*, (FIG. 2). En bilis exclusivamente, se aisló además *Proteus* spp. (TABLA IV). En todas las granjas evaluadas (G3 - G5), la prueba de Acriflavina reveló la presencia de cepa Lisa (patógena) de *Salmonella* (TABLA III).

En este mismo lote se evaluaron los signos anatomopatológicos que afectaron vesícula biliar, hígado, molleja y el sistema urinario, en un total de 44 pollitas afectadas de las granjas G3-G5 (TABLA IV).

En el caso III se evaluó un lote de 10 pollitas de Levante de la línea: H&N, edad 4 - 5 días, se practicaron exámenes bacteriológicos y anatomopatológicos (lesiones macroscópicas), aislándose en todas las muestras *Salmonella* spp. (inmóvil), acompañada en hígado con *Enterobacter* spp., y en molleja con *E. coli*. La prueba de Acriflavina reveló la presencia de cepa lisa (patógena) de *Salmonella* (TABLA V).



FIGURA 2. Cultivos directos y selectivos para *Salmonella* spp.

TABLA II
CASO I. Lesiones macroscópicas y examen bacteriológico.
Levante de pollitas, línea H&N, edad 4 - 5 días

| Número de aves | Lesiones Macroscópicas (Signos Post Mortem) | Aislamientos bacterianos en | Resultados |
|----------------|---|-----------------------------|--|
| 8/8 | Deposición de uratos en uréteres | Hígado | Crece regular cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 7/8 | Hepatomegalia, taponamiento cloacal | Corazón | Crece regular cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 3/8 | Esplenitis, saco vitelino de color verduzco, vesícula biliar licuefacta de color amarillo | Médula ósea | Crece regular cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 2/8 | Molleja erosionada y ulcerosa | Saco vitelino | Crece abundante cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| - | - | Bilis | Crece escasa cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| - | - | Prueba de Acriflavina | Presencia de <i>Salmonella</i> spp. cepa lisa (patógena) |

Ensayo en planta de incubación

Todas las muestras presentaron alta contaminación con *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. y el 40 % de los embriones remitidos estaban licuados. El desarrollo embrionario de los embriones corresponde a pocas horas de incubación y hasta antes de los 7 días (TABLA VI).

Resultados en aves reproductoras

El lote de donde se originaron los embriones y las pollitas positivas a *Salmonella* spp. (inmóvil) fue sometido a fusil sanitario. En total fueron 3 lotes de 5.000 aves con edades comprendidas entre 27 y 60 semanas. La *Salmonella* spp. resultó ausente de órganos de Reproductoras de 60 semanas, especialmente hígado, bazo, médula ósea y tonsilas cecales, en 8 hisopados cecales de piso de Reproductoras de 27-39 semanas de edad y en 16 hisopados cloacales.

En Reproductoras de 43 semanas se investigó en órganos de aves muertas, con hisopados de contenido cecal, obteniendo muestras de aves positivas con *Salmonella* spp. (inmóvil) (FIG. 3). Según los resultados bacteriológicos y bioquímicos, la reacción a la ornitina (+) y la generación de ácido y gas en presencia de Manitol, corroboran la presencia de *S. enterica* biovar Pullorum (TABLA VII).

Las muestras de los casos III y IV confirmaron la presencia de *Salmonella enterica* biovar Pullorum, según consta en el Informe de ensayo Oficial del Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras, Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria-SENASAG, Unidad Nacional de Laboratorios, UNALAB CBBA, Cochabamba Bolivia (FIG. 4).

La fiebre tifoidea aviar afecta gravemente el desarrollo y la producción de la industria avícola. Consegir información epidemiológica oficial sobre la infección de *Salmonella* spp. es algo complejo, sin embargo existen datos de otras regiones del mundo que indican los elevados costos que ello representa, con el atenuante de que en muchos de esos países se llevan estrictas medidas en toda la estructura sanitaria para el control de la Salmonelosis, e incluso de

TABLA III
CASO II. Levante de pollitas, línea H&N, edad 5 días. Aislamientos bacterianos.

| Aislamientos bacterianos en | Granja 3 | Granja 4 | Granja 5 |
|-----------------------------|---|--|---|
| Hígado | Crece escasa cantidad de <i>Escherichia coli</i> y abundante <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece una colonia de <i>E. coli</i> y abundante cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece regular cantidad de <i>E. coli</i> y abundante <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| Bazo | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y abundante <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y regular <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece regular cantidad de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| Corazón | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y abundante <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crecen dos colonias de <i>E. coli</i> y regular cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece regular cantidad de <i>E. coli</i> y abundante cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| Médula ósea | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y regular <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y regular <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| Saco vitelino | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y regular <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crecen seis colonias de <i>E. coli</i> y regular cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece regular cantidad de <i>E. coli</i> y abundante <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| Bilis | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> y regular <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece escasa cantidad de <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp. y <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) | Crece regular cantidad de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| Prueba de Acriflavina | Presencia de cepa lisa (patógena) | Presencia de cepa Lisa (patógena) | Presencia de cepa lisa (patógena) |

TABLA IV

Caso II. Lesiones macroscópicas. Levante de pollitas, línea H&N, edad 5 días. Granjas G3-G5

| Granja | Número de aves | Lesiones macroscópicas (Signos Post Mortem) |
|--------|----------------|--|
| G3 | 12/20 | Vesícula biliar distendida, esplenomegalia, onfalitis. |
| | 8/20 | Focos necróticos en hígado |
| G4 | 14/20 | Esplenomegalia, focos necróticos en hígado, onfalitis |
| | 13/20 | Vesícula biliar distendida |
| | 8/20 | molleja con erosiones |
| | 6/20 | Deposición de uratos en uréteres, molleja erosionada, |
| | 3/4 | Focos necróticos en hígado, onfalitis |
| G5 | 2/4 | Vesícula biliar distendida, molleja erosionada |
| | 1/4 | Deposición de uratos en uréteres |

TABLA V

Caso III. Lesiones macroscópicas y aislamientos bacteriológicos. Levante de pollitas, línea H&N, edad 4 - 5 días

| Número de aves | Lesiones Macroscópicas (Signos Post Mortem) | Aislamientos bacterianos en: | Resultados |
|-----------------------|--|------------------------------|---|
| 10/10 | Hígado friable | Hígado | Crecen tres colonias de <i>Enterobacter</i> spp, y abundante cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 9/10 | Deposición de uratos en uréteres | Corazón | Crece abundante cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 8/10 | Hígado con focos necróticos blanquecinos, vesícula biliar distendida | Médula ósea | Crece escasa cantidad de <i>Enterobacter</i> spp. y regular <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 6/10 | Hepatomegalia, onfalitis, nefritis intersticial, onfalitis | Saco vitelino | Crece escasa cantidad de <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 4/10 | Molleja erosionada, bilis licuefacto y de color amarillo. Nefritis degenerativa, | Bilis | Crece escasa cantidad de <i>Escherichia coli</i> y abundante <i>Salmonella</i> spp. (inmóvil) |
| 3/10 | Molleja ulcerosa | - | - |
| Prueba de acriflavina | Presencia de cepa lisa (patógena) | - | - |

TABLA VI

Ensayo en la planta de incubación (Muestra IV)

| Muestras | Investigación de <i>Salmonella</i> spp. |
|------------------------------------|---|
| L-3 huevo-embrión picado no nacido | Presencia |
| L-3 huevo-licuefacto | Presencia |
| L-4 huevo-embrión picado no nacido | Ausencia |
| L-4 huevo-licuefacto | Ausencia |

su erradicación en el caso de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, habiéndose decretados libres de tifosis, por ausencia de casos, desde el año 2015 [17]. Este brote afecto a 27.000 pollitas en levante, las cuales sufrieron un 30 % de mortalidad, observándose en el resto, una morbilidad superior al 80 %, por lo cual fueron sacrificadas en su totalidad. Igualmente, se les aplico el fusil sanitario a 3 lotes de 5.000 Reproductoras, madres de estas pollitas y se retiraron sus huevos fértiles de la incubadora. El costo directo se estima en 500.000 USD, pudiendo totalizar hasta 1 millón de dólares en pérdidas indirectas.

TABLA VII

Medios de cultivo utilizados en identificación bioquímica de los alimentos bacteriológicos para *Salmonellas*

| Medio de Cultivo | Reacción | Resultado | Observaciones |
|------------------|-------------------------|-----------|--|
| TSI A/K | Glucosa | + | Escaso Escasa producción mayor a 24 h |
| | Lactosa | - | |
| | Sacarosa | - | |
| | Gas | ± | |
| LIA | SH ₂ | ± | Escaso producción mayor a 24 h |
| | Lisina Descarboxilasa | + | |
| CS | Citrato | - | |
| U | Urea | - | |
| SIM | SH ₂ | ± | Escaso producción mayor a 24 h |
| | Indol | + | |
| RM / VP | Motilidad | - | + mayor a 72 h. Escaso enturbiamiento |
| | Rojo de metilo | d | |
| MIO | Voges Proskauer | - | |
| | Motilidad | - | |
| Manitol | Indol | + | |
| | Ornitina Descarboxilasa | + | |
| | Manitol | + | Ácido y gas |



FIGURA 3. Resultados medios de cultivos, utilizados para la identificación bioquímica diferencial para *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*

MINISTERIO DE DESARROLLO RURAL Y TIERRAS
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA E INOCUIDAD ALIMENTARIA - SENASAG
UNIDAD NACIONAL DE LABORATORIOS
UNALAB CBBA

RF-LA-017 Revisión: 00 Emisión: 2020/09/29 Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

| | | | |
|---|--|-----------------------------------|------------------------|
| N° Código: | 37213 | Acta de muestreo: | ---- |
| Propietario o Nombre del establecimiento: | ADA - CBBA | N° Registro del Establecimiento: | ---- |
| Solicitante: | ADA - CBBA | Remitente: | MVZ. Rubén Príncipe |
| Dirección y teléfono: | Cochabamba - Quillacollo - Colcapirhua Telf: 77494548 | Objeto de análisis: | INVESTIGACION |
| Descripción de la muestra: | 2 TUBOS CON CEPA AISLADA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. INMOVIL 13193 (L-9) | | |
| Información adicional: | ---- | Fecha y hora de recepción (Lab.): | 2021-03-15 12 h 30 min |
| Fecha y hora de muestreo: | ---- | Fecha y hora inicio de ensayo: | 2021-03-16 08 h 00 min |
| Muestreado por: | Dra- Martha Caero | Fecha y hora final del ensayo: | 2021-03-17 09 h 00 min |

RESULTADOS

BIOLOGÍA MOLECULAR
13193 (L-9)

| ENSAYOS REALIZADOS | REFERENCIA DEL MÉTODO | RESULTADO OBTENIDO | LÍMITE PERMITIDO | REFERENCIA DEL LÍMITE |
|------------------------------|--|--------------------|------------------|--|
| <i>Salmonella pullorum</i> | OIE. Código Sanitario para Animales Terrestres. 3.3.11/2018. | PRESENCIA | Ausencia | Resolución Administrativa 119/2002 - SENASAG |
| <i>Salmonella gallinarum</i> | | Ausencia | Ausencia | |

Condiciones ambientales: Temperatura: 19°C; Humedad: 58%

Abreviaciones:
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

Observaciones: Positivo a *Salmonella enterica* biovar *pullorum*

13068 (L-3)

| ENSAYOS REALIZADOS | REFERENCIA DEL MÉTODO | RESULTADO OBTENIDO | LÍMITE PERMITIDO | REFERENCIA DEL LÍMITE |
|------------------------------|--|--------------------|------------------|--|
| <i>Salmonella pullorum</i> | OIE. Código Sanitario para Animales Terrestres. 3.3.11/2018. | PRESENCIA | Ausencia | Resolución Administrativa 119/2002 - SENASAG |
| <i>Salmonella gallinarum</i> | | Ausencia | Ausencia | |

Condiciones ambientales: Temperatura: 19°C; Humedad: 58%

Abreviaciones:
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

Observaciones: Positivo a *Salmonella enterica* biovar *pullorum*

"NO REPRODUCIR ESTE INFORME DE ENSAYO DE MANERA TOTAL O PARCIAL"
Cualquier alteración, sustitución, adulteración o manipulación en el informe de ensayo, anula su validez.
Fecha de impresión: 17/03/2021 10:11:08

Dirección: Av. Blanco Galindo, Km. 12.5. Calle Cincinato Prada s/n Quillacollo
Teléfonos: (591-4) 4260633 • 4262784 • Fax: Int. 102 • E-mail: unalab.cbba@senasag.gob.bo
Cochabamba - Bolivia

RF-LA-017 Revisión: 00 Emisión: 2020/09/29 Página 2 de 2

EL O LOS RESULTADOS REFIEREN A LA MUESTRA REMITIDA AL LABORATORIO POR EL SOLICITANTE.

EL LABORATORIO NO SE RESPONSABILIZA POR LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE, COMO SER: CANTIDAD DE MUESTRA REMITIDA, HOMOGENEIDAD Y REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA, CONDICIONES AMBIENTALES DE TRANSPORTE PARA LA REMISIÓN Y OTROS QUE PUEDA AFECTAR A LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS.

Quillacollo, 17 de marzo de 2021





REVISADO POR
AUTORIZADO POR

Fin del informe

FIGURA 4. Ensayo de biología molecular para *Salmonella pullorum*. Informe Oficial del Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras, Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria-SENASAG, Unidad Nacional de Laboratorios, UNALAB CBBA. Cochabamba, Bolivia

A pesar de esto, se aisló *S. gallinarum* de muestras recolectadas en la necropsia de pollitos, de un brote con una tasa de mortalidad del 33,7 %, al noveno día después del nacimiento. Las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. fueron aisladas de un grupo de órganos (hígado, bazo, corazón y saco vitelino). En las pruebas bioquímicas y serológicas, las colonias fueron compatibles con *S. gallinarum*. La confirmación del serotipo se realizó mediante caracterización antigénica para *Salmonella* spp. y por Premi® test [14]. Resultados obtenidos del periodo 2018-2019 en Cochabamba, Bolivia muestran una incidencia del 28,5 % de la *Salmonella* spp. (inmóvil) y una ausencia de 70,9 % [24].

Los planes de control deberían retomar la prueba serológica con el antígeno de Pullorum [11, 13] en levante de pollitas, para descartar y eliminar las aves positivas, previo a la fecha de aplicación de vacunas parenterales vivas o inactivadas contra *Salmonella*.

Nuevas iniciativas de investigación demuestran que la preocupación sobre la reemergencia de la *S. pullorum* sigue vigente en el mundo. Se desarrolló el mutante *waal* en un *spiC* mutante con características de seguridad, eficacia y DIVA (Diferenciación de Animales Infectados y Vacunados), vacuna candidata para *Salmonella* Pullorum Δ *spiC* Δ *waal*, evaluada en pollos de engorde. El lipopolisacárido (LPS) truncado en la cepa vacunal tiene un uso diferenciador, tanto como marcador bacteriológico (fenotipo rugoso) como marcador serológico que facilita la diferenciación entre pollos infectados y vacunados [4]. De ser aprobada, esta candidata vacunal aportará otra excelente alternativa para apoyar las medidas de control frente a la Pulloriosis aviar.

CONCLUSIONES

Queda confirmada la re-emergencia en Bolivia, de la *Salmonella enterica* biovar Pullorum. Las características estructurales complejas del genoma de la *S. pullorum*, su sofisticado mecanismo de infección a nivel de la mucosa intestinal, su capacidad para modular la respuesta inmunitaria favoreciendo el estado de "portador" y posterior transmisión al ave recién nacida, le otorgan a esta *Salmonella* caracteres únicos que deben ser combatidos, retomando las tradicionales pruebas serológicas de Pullorosis, aún vigentes en los manuales de la OIE como vigilancia epidemiológica y diseñando otras medidas de control, fundamentadas en los nuevos avances del conocimiento sobre esta bacteria, incluyendo las nuevas vacunas.

La re-emergencia de *S. pullorum* en la región de Cochabamba, Bolivia, sorpresivamente en pleno corazón geográfico de Latinoamérica, refuerza la hipótesis planteada con anterioridad sobre la vigencia del estado de portador silente de esta bacteria, por sus propiedades inmunomoduladoras y las características genómicas superiores al resto de las *Salmonellas*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARROW, P.A.; FREITAS-NETO, O.C. Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathol.** 40(1): 1-13. 2011.
- [2] DALAI, N.; SHEKHAR, S.; PADHY, A.; PRAVEEN, P. K.; SAHU, A. R. Salmonellosis - A potential threat to poultry: a mini review. **J. Cell. Tissue Res.** 15(3): 5209-5213. 2015.
- [3] DE ANDRADE, R.B.; GEMELLI, T.; DALL-ONDER, L.P.; CRISTINA, K.; DE BRITO, T.; BARBOZA, A.A.L.; DE BRITO, B.G. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. **Arq. Inst. Biol. São Paulo.** 77(4): 741-750. 2010.
- [4] GUO, R.; JIAO, Y.; LI, Z.; ZHU, S.; FEI, X.; GENG, S.; PAN, Z.; CHEN, X.; LI, Q.; JIAO, X. Safety, Protective Immunity, and DIVA Capability of a Rough Mutant *Salmonella pullorum* Vaccine Candidate in Broilers. **Front. Microbiol.** 8: 547. 1-10. 2017. <https://doi.org/hpp2>.
- [5] HAIDER, G.; CHOWDHURY, E.H.; HOSSAIN, M. Mode of vertical transmission of *Salmonella enterica* sub. *enterica* serovar Pullorum in chickens. **Afr. J. Microbiol. Res.** 8: 1344-1351. 2014.
- [6] HASAN, R.A.; ALI, M.H.; SIDDIQUE, M.P.; RAHMA, M.M.; ISLAM, M.A. Clinical and laboratory diagnoses of common bacterial diseases of broilers and layer chickens. **Bangladesh J. Vet. Med.** 8(2): 107-115. 2010.
- [7] KANG, M.S.; YONG-KUK, K.; HYE-RYOUNG, K.; JAE-YOUNG, O.; MI-JIN, K.; BYUNG-KI, A.; EUN-GYEONG, S.; JUN-HUN, K.; WON, C. Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. **Vet. Microbiol.** 160(3-4): 491-495. 2012. <https://doi.org/f4gp6t>.
- [8] LI, X.; NIE, C.; ZHANG, Z.; WANG, Q.; SHAO, P.; ZHAO, Q.; QU, L. Evaluation of genetic resistance to *Salmonella pullorum* in three chicken lines. **Poult. Sci.** 97(3): 764-769. 2018.
- [9] LIU, G.R.; RAHN, A.; WEI-QIAO, L.; KENNETH, E.; SANDERSON, R.; JOHNSTON, N.; SHU-LIN, L. The Evolving Genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. **J. Bacteriol.** 184(10): 2626-2633. 2002.
- [10] MA, X.; JIANG, Y.; JIA, F.; YU, Y.; CHEN, J.; WANG, Z. An aptamerbased electrochemical biosensor for the detection of *Salmonella*. **J. Microbiol. Meth.** 98: 94-98. 2014.
- [11] MUKTARUZZAMAN, M.; HAIDER, M.G.; AHMED, A.K.M.; ALAM, K.J.; RAHMAN, M.M.; KHATUN, M.B.; RAHMAN, M.H.; HOSSAIN, M.M. Validation and Refinement of *Salmonella pullorum* (SP) Colored Antigen for Diagnosis of Salmonella Infections in the Field. **Int. J. Poult. Sci.** 9(8): 801-808. 2010.
- [12] NEISH-ANDREW, S.; ANDREW, T.; ZENG, H.; ANDREW, N.; MICHAEL, Y.; HOBERT, E.; KARMALI, V.; ANJALI, S.R.; MADARA, J.L. Prokaryotic Regulation of Epithelial Responses by Inhibition of I κ B- α Ubiquitination. **Sci.** 289(5484): 1560-1563. 2000. <https://doi.org/dw8q97>.
- [13] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Cap 3.3.11. **Pulorosis y Tifosis Aviar.** Pp 19. 2021.
- [14] PERDONCINI, G.; PULIDO, M.; TONINI-ROCHA, D.; FERREIRA, J.; TROLLER-PINTO, A.; PINHEIRO DO NASCIMENTO, V. Fowl typhoid in table egg farm in process of certification for organic production in the south of Brazil. **World's Poult. Sci. J.** 81(1): 351-354. 2012.
- [15] PULIDO-LANDÍNEZ, M. Food safety-Salmonella update in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.** 250: 53-58. 2019.
- [16] RIVERA-PIRELA, S.; *Salmonella pullorum* en aves, el enemigo silencioso. **REDVET.** 19(5): 17-24. 2018.
- [17] SADER, S. Auto-declaración de México como país libre de Pulorosis y Tifosis aviar en las aves de corral. 2019. Dirección

General de Salud. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. En línea: <https://bit.ly/3LKvmpG>. 05-09-2021.

- [18] SANTANA, E.S.; OLIVEIRA, F.H.; ROCHA, T.M.; SANTANA, R.R.; ANDRADE, M.A. Abordage sobre *Salmonella* spp. com enfoque na caracterização, patogênese e métodos de diagnóstico em aves. **Enciclop. Biosfera**. 7(12): 1-23. 2011.
- [19] SEVER, N.K.; AKAN, M.; Molecular analysis of virulence genes of *Salmonella* Infantis isolated from chickens and turkeys. **Microbial Pathogen**. 126: 199-204. 2019.
- [20] SPICKLER, A.R.; ROTH, J.A.; DVORAK, G. Prevalence and Characterization of *Salmonella pullorum* from Day Old Chicks distributed to Farms in Akwa Ibom State, Nigeria. **Emerging and exotic diseases of Animals**. 4th Ed. CFSPH Iowa State University, Iowa USA. Pp. 165-168. 2010.
- [21] TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.D.A; GARRITY, G.M.; EUZE, J.P.; Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Intern. J. System. Evolut. Microbiol**. 55: 521-524. 2005.
- [22] VON-HERTWIG, A. M.; AMORIM-NETO, D.P.; APARECIDA DE A., E.; TIBAS-CASAS, M.R.; DA SILVA DO NASCIMENTO, M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and virulence profile of *Salmonella* isolated from the peanut supply chain. **Intern. J. Food Microbiol**. 294: 50-54. 2019.
- [23] WEI, B.; SHANG, K.; CHA, S.; ZHANG, J.; KANG, M.; JANG, H.K. Prevalence and potential risk of *Salmonella enterica* in migratory birds from South Korea. **Vet. Microbiol**. 249: 108829. 2019.
- [24] ZENTENO-LUNA, A.R. Comportamiento de la *Salmonella* spp. (inmóvil) con respecto a los antibiogramas en ponedoras comerciales del departamento Cochabamba, Bolivia. Universidad Mayor de San Simon. Facultad de Ciencias Veterinarias. Tesis de Grado. Pp 186. 2019.