



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Prevalencia de *Salmonella enterica* en *Gallus gallus*, evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos y estrategias para eliminar biopelículas

Tesista: Lic. Francisco Procura

Director/a: Dr. Dante Javier Bueno

Codirector/a: Dra. Marina A. Golowczyc

Año: 2024

*“Los países ricos lo son porque dedican
dinero al desarrollo científico-tecnológico,
y los países pobres lo siguen siendo
porque no lo hacen”*

Bernardo Houssay

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que de una u otra forma han contribuido en la realización de este trabajo.

En especial a mis directores Dante y Marina, por su apoyo y guía para la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Pública de Argentina, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por permitir desarrollar la producción pública de conocimiento. En especial a la Universidad Nacional de La Plata y a la Universidad Nacional de Entre Ríos.

ÍNDICE GENERAL

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	23
ABREVIATURAS	25
RESUMEN.....	28
INTRODUCCIÓN GENERAL	31
1. PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN ARGENTINA.....	32
2. PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS	33
3. RIESGOS SANITARIOS EN GRANJAS.....	34
4. GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	35
4.1. <i>SALMONELLA</i> SPP. Y HOSPEDADORES	37
4.2. DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	38
4.2.1. Métodos inmunológicos.....	39
4.2.2. Métodos basados en el ácido nucleico.....	39
4.2.3. Métodos microbiológicos tradicionales	40
4.3. <i>SALMONELLA</i> SPP. Y SALUD PÚBLICA.....	44
4.4. REGLAMENTACIONES SOBRE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN ARGENTINA.....	45
5. BIOSEGURIDAD E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO EN GRANJAS.....	46
6. ANTIBIÓTICOS.....	48
6.1. CLASIFICACIÓN.....	49
6.1.1. β -lactámicos.....	49
6.1.1.1. Penicilinas	49
6.1.1.2. Cefalosporina	50
6.1.1.3. Monobactámicos	50
6.1.1.4. Carbapenémicos	50
6.1.2. Macrólidos.....	51
6.1.3. Aminoglucósidos y Tetraciclina	51

6.1.4.	Quinolonas.....	52
6.1.5.	Sulfonamidas	52
6.2.	USO DE ANTIBIÓTICOS EN GRANJAS DE CRÍA INTENSIVA.....	52
6.3.	RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	55
7.	ACEITES ESENCIALES COMO ALTERNATIVA A LOS ANTIBIÓTICOS	57
7.1.	Aceite esencial de orégano	58
7.2.	Aceite esencial de romero.....	59
7.3.	Aceite esencial de espartillo	60
8.	DESINFECTANTES	61
8.1.	FACTORES QUE PUEDEN COMPROMETER LA EFICACIA DE LOS DESINFECTANTES.....	61
8.2.	CLASIFICACIÓN.....	62
8.2.1.	Ácidos	62
8.2.2.	Alcoholes	62
8.2.3.	Aldehídos	63
8.2.4.	Álcalis	63
8.2.5.	Biguanidas	64
8.2.6.	Halógenos.....	65
8.2.7.	Agentes oxidantes.....	66
8.2.8.	Fenoles	66
8.2.9.	Compuestos de amonio cuaternario.....	67
9.	BIOPELÍCULAS	67
9.1.	ESTRUCTURAS Y ETAPAS IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	68
9.2.	MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS	71
9.3.	IMPORTANCIA DE LAS BIOPELÍCULAS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA.....	73
9.4.	RESISTENCIA DE BIOPELÍCULAS FRENTE A AGENTES QUÍMICOS.....	75

9.4.1.	Desinfectantes	75
9.4.2.	Antibióticos.....	77
9.5.	ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN.....	78
9.6.	ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN	78
9.6.1.	Probióticos, bacterias ácido lácticas y bacteriocinas	79
9.6.2.	Proteínas de superficie y metabolitos.....	80
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		82
HIPÓTESIS		83
OBJETIVO GENERAL		83
OBJETIVOS ESPECÍFICOS		83
CAPÍTULO 1		84
COMPARACIÓN DE TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL AISLAMIENTO DE SALMONELLA SPP. EN MUESTRAS DE GUANO DE AVES DE POSTURA.....		84
1. INTRODUCCIÓN		85
2. MATERIALES Y MÉTODOS		87
2.1.	GUANO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON <i>SALMONELLA</i> SPP.....	87
2.1.1.	Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación	87
2.1.2.	Cepas de <i>Salmonella</i> spp. empleadas para los ensayos de inoculación .	87
2.1.3.	Determinación de las bacterias dañadas.....	87
2.1.4.	Preparación de los inóculos de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de guano de aves de postura.....	88
2.1.5.	Recuperación de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. en el guano inoculado...	88
2.1.6.	Criterios de capacidad discriminatoria y límite de detección de las técnicas y medios de cultivos utilizados para la recuperación de <i>Salmonella</i> spp.	91
2.1.7.	Concordancia de las técnicas y medios de cultivos utilizados para la recuperación de <i>Salmonella</i> spp.....	92
2.1.8.	Análisis estadístico.....	92

2.2.	GUANO ESTERIL CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON <i>SALMONELLA</i> SPP. INMÓVIL Y <i>ESCHERICHIA COLI</i>	93
2.2.1.	Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación	93
2.2.2.	Cepas empleadas para los ensayos de inoculación	93
2.2.3.	Determinación de las bacterias dañadas.....	93
2.2.4.	Preparación de los inóculos de <i>Salmonella spp.</i> y <i>E. coli</i> en muestras de guano de aves de postura	93
2.2.5.	Estudio de la competencia bacteriana entre <i>Salmonella spp.</i> inmóviles y <i>E. coli</i> inoculadas en guano estéril.....	94
3.	RESULTADOS.....	97
3.1.	GUANO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON <i>SALMONELLA</i> SPP.....	97
3.1.1.	Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación	97
3.1.3.	Límite de detección de las técnicas utilizadas para la recuperación de <i>Salmonella spp.</i>	97
3.1.4.	Criterios de capacidad discriminatoria de las técnicas utilizadas para la recuperación de <i>Salmonella spp.</i>	101
3.1.5.	Concordancia de las técnicas utilizadas para la recuperación de <i>Salmonella spp.</i>	101
3.1.6.	Criterios de capacidad discriminatoria de los medios utilizados para la recuperación de <i>Salmonella spp.</i>	106
3.1.7.	Concordancia de los medios utilizados para la recuperación de <i>Salmonella spp.</i>	113
3.2.	GUANO ESTERIL CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON <i>SALMONELLA</i> SPP. INVÓVIL Y <i>E. COLI</i>	116
3.2.1.	Recuentos de <i>Salmonella spp.</i> inmóviles y <i>E. coli</i> inoculadas en guano estéril y porcentaje de cepas dañadas.....	116
3.2.2.	Aislamiento de <i>Salmonella spp.</i> inmóviles y <i>E. coli</i> inoculadas en guano estéril.....	119
4.	DISCUSIÓN	120

5. CONCLUSIONES	123
CAPÍTULO 2	124
PREVALENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GRANJAS DE GALLINAS DE POSTURA, DE POLLOS PARRILLEROS E HÍGADOS DE POLLO PARA CONSUMO	124
1. INTRODUCCIÓN	125
2. MATERIALES Y MÉTODOS	128
2.1. MUESTREO.....	128
2.1.1. Tamaño de muestra	128
2.1.1.1. Granjas de gallinas de postura.....	128
2.1.1.2. Granjas de pollos parrilleros.....	129
2.1.1.2. Hígados de pollos parrilleros	131
2.1.2. Criterio del muestreo	131
2.1.3. Tipos de muestras.....	132
2.1.3.1. Alimento	132
2.1.3.2. Hisopados de cama.....	133
2.1.3.3. Aves muertas	133
2.1.3.4. Guano	133
2.1.3.5. Huevos	133
2.1.3.6. Hisopados cloacales.....	133
2.1.3.7. Hígado de pollo	134
2.1.4. Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	134
2.1.4.1. Alimento	134
2.1.4.2. Hisopado de cama	135
2.1.4.3. Aves muertas	136
2.1.4.4. Guano	139
2.1.4.5. Huevos	139
2.1.4.6. Hisopado cloacal de aves vivas.....	141

2.1.4.7.	Hígados de pollos parrilleros	141
2.1.5.	Identificación de las colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp.	143
2.1.6.	Serotipificación.....	143
2.1.7.	Confirmación de los aislamientos por reacción en cadena de la polimerasa.....	144
2.1.7.1.	Extracción de ADN	144
2.1.7.2.	PCR para <i>Salmonella</i> spp.	144
2.1.7.3.	PCR para <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serotipo Enteritidis.....	145
2.1.7.4.	PCR para <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serotipo Typhimurium.....	145
2.1.7.5.	Visualización de los fragmentos de ADN amplificados	146
2.1.8.	Estudios de capacidad discriminatoria y concordancia.....	146
2.1.9.	Identificación de factores de riesgo	146
2.1.9.1.	Diseño del cuestionario	146
2.1.9.2.	Procesado de los datos y análisis estadístico.....	147
3.	RESULTADOS.....	148
3.1.	AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SPP.....	148
3.1.1.	Granja de gallinas de postura	148
3.1.2.	Granja de pollos parrilleros	150
3.1.3.	Hígados de pollos parrilleros para consumo	151
3.1.4.	Confirmación bioquímica e identificación de <i>Salmonella</i> spp.	152
3.1.5.	Serotipificación de los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.....	152
3.1.5.1.	Granja de gallinas de postura.....	152
3.1.5.2.	Granja de pollos parrilleros.....	155
3.1.5.3.	Hígados de pollos parrilleros para consumo	159
3.1.5.	Confirmación de <i>Salmonella</i> spp. por PCR	159

3.1.6.	Prevalencia de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum en las granjas.....	160
3.1.6.1.	Granjas de gallina de postura.....	160
3.1.6.2.	Granja de pollos parrilleros.....	162
3.2.	RENDIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES	164
3.2.1.	Estudios de capacidad discriminatoria y concordancia.....	164
3.2.1.1.	Granjas de gallinas de postura.....	164
3.2.1.3.	Hígados de pollos parrilleros para consumo.....	169
3.3.	IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO.....	171
3.3.1.	Resultado de los cuestionarios	171
3.3.1.1.	Granjas de gallinas de postura.....	171
3.3.1.2.	Granjas de pollos parrilleros.....	176
3.3.2.	Procesado de los datos y análisis estadístico para asociar factores de riesgos a la presencia de <i>Salmonella</i> spp.....	180
3.3.2.1.	Granjas de gallinas de postura.....	180
3.3.2.2.	Granjas de pollos parrilleros.....	185
4.	DISCUSIÓN.....	189
4.1.	PREVALENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. Y DE LOS SEROVARES ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM	189
4.2.	CAPACIDAD DISCRIMINATORIA DE LAS TÉCNICAS Y LOS MEDIOS DE CULTIVOS SÓLIDOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES.....	194
4.3.	FACTORES DE RIESGOS PARA <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS Y POLLOS PARRILLEROS.....	196
5.	CONCLUSIONES	199
5.1.	PREVALENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. Y DE LOS SEROVARES ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM	199

5.2. CAPACIDAD DISCRIMINATORIA DE LAS TÉCNICAS Y LOS MEDIOS DE CULTIVOS SÓLIDOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES EMPLEADOS EN EL AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SPP.....	199
5.3. FACTORES DE RIESGOS PARA <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS Y POLLOS PARRILLEROS EN LA ZONA DE MAYOR DENSIDAD DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	200
CAPÍTULO 3	201
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS Y SU BIOCONTROL POR BACTERIAS LÁCTICAS.....	201
1. INTRODUCCIÓN	202
2. MATERIALES Y MÉTODOS	204
2.1. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM.....	204
2.1.1. Cepas utilizadas.....	204
2.1.2. Producción de biopelículas de cepas de <i>Salmonella</i> spp.	204
2.1.2.1. Tinción con cristal violeta en microplacas	204
2.1.2.2. Formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo.....	206
2.1.2.3. Estudio de la producción de curli y celulosa por morfología de colonia en rojo congo.....	207
2.1.2.4. Prueba de producto comercial “BioFinder”	207
2.1.3. Comparación de técnicas.....	207
2.2.1. Cepas utilizadas.....	208
2.2.2. Efecto de las BAL sobre la formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> spp.	208
2.2.2.1. Con las BAL enteras	208
2.2.2.2. Con el sobrenadante de cultivo libre de células	209
2.2.3. Análisis estadístico	209

3. RESULTADOS.....	210
3.1. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS	210
3.1.1. Tinción con cristal violeta en microplacas	210
3.1.2. Formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo	210
3.1.3. Producción de curli y celulosa por morfología de colonia en rojo congo	211
3.1.4. Prueba de producto comercial “BioFinder”	213
3.1.5 Comparación de técnicas.....	213
3.2. CAPACIDAD DE LAS BAL Y SUS SOBRENADANTES PARA MODIFICAR LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS Y S. SER. TYPHIMURIUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	215
3.2.1 Efecto de las BAL sobre la formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> spp.	215
4. DISCUSIÓN	218
5. CONCLUSIONES	222
CAPÍTULO 4	223
SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	223
1. INTRODUCCIÓN	224
2. MATERIALES Y MÉTODOS	227
2.1. CEPAS UTILIZADAS	227
2.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA	227
2.2.1. Determinación de co-resistencia	229
2.3. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM) ...	229

2.4.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS COMERCIALES UTILIZADOS EN GRANJAS AVÍCOLAS	230
2.5.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A OTROS ANTIMICROBIANOS.....	233
2.6.	PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DESINFECTANTES	233
2.7.	DESINFECTANTES SOBRE SUPERFICIES, EN CEPAS PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS	236
2.7.1.	Análisis estadístico.....	237
3.	RESULTADOS.....	238
3.1.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA	238
3.1.1.	Determinación de co-resistencia	240
3.2.	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM) ...	241
3.3.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS COMERCIALES UTILIZADOS EN GRANJAS	243
3.4.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A OTROS ANTIMICROBIANOS.....	246
3.5.	PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DESINFECTANTES	248
3.6.	EFFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE <i>SALMONELLA</i> EN BIOPELÍCULAS EN DIFERENTES SUPERFICIES	252
4.	DISCUSIÓN	256
5.	CONCLUSIONES	261
	DISCUSIÓN GENERAL	262
	PROYECCIONES	265
	ANEXOS	267
	ANEXO 1: ENCUESTA REALIZADA EN GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS....	268
	ANEXO 2: ENCUESTA REALIZADA EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS...	274
	REFERENCIAS	279

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. NÚMERO DE ESPECIES, SUBESPECIES Y SEROVARIEDADES DEL GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	36
TABLA 2. FUNCIONES DE LOS INGREDIENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO UTILIZADOS PARA EL AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SPP.....	41
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS BACTERIANAS COMPATIBLES CON <i>SALMONELLA</i> SPP. EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS DIFERENCIALES AGARIZADOS	42
TABLA 4. REACCIONES BIOQUÍMICAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP.....	43
TABLA 5. EJEMPLOS DE FÓRMULAS ANTIGÉNICAS DE LAS SEROVARIEDADES DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SUBSP. <i>ENTERICA</i> DE ACUERDO CON EL ESQUEMA DE WHITE- KAUFFMANN- LEMINOR.....	43
TABLA 6. CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE INOCULACIÓN.....	88
TABLA 7. CEPAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE INOCULACIÓN.....	93
TABLA 8. RECUENTOS DE BACTERIAS TOTALES, ENTEROBACTERIAS Y HONGOS REALIZADOS EN LAS 8 MUESTRAS DE GUANO ENSAYADAS.....	97
TABLA 9. PORCENTAJE DEL DAÑO NATURAL DE CADA CEPA DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	98
TABLA 10. RESULTADOS OBTENIDOS AL INOCULAR LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) EN GUANO DE AVES Y POSTERIOR AISLAMIENTO MEDIANTE LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO MODIFICADO RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD Y TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH)	99
TABLA 11. RESULTADOS OBTENIDOS AL INOCULAR LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR POULLORUM (SP) EN GUANO DE AVES Y POSTERIOR AISLAMIENTO MEDIANTE LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO MODIFICADO RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD Y TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH).....	100

TABLA 12. SENSIBILIDAD (SE), EXACTITUD (EXA) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN) DE LAS TÉCNICAS MEDIO SEMISÓLIDO MODIFICADO RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD Y TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LOS SEROTIPOS MÓVILES DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN MUESTRAS DE GUANO DE AVES DE POSTURA CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE.....	102
TABLA 13. SENSIBILIDAD (SE), EXACTITUD (EXA) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN) DE LAS TÉCNICAS MEDIO SEMISÓLIDO MODIFICADO RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD Y TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LOS SEROTIPOS INMÓVILES DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN MUESTRAS DE GUANO DE AVES DE POSTURA CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE.....	103
TABLA 14. CONCORDANCIA (COEFICIENTE KAPPA Y TEST DE MCNEMAR) ENTRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO PARA MUESTRAS DE GUANO CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE CON <i>SALMONELLA</i> SPP. MÓVIL.	104
TABLA 15. CONCORDANCIA (COEFICIENTE KAPPA Y TEST MCNEMAR) ENTRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO PARA MUESTRAS DE GUANO CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE CON <i>SALMONELLA</i> SPP. INMÓVIL.....	105
TABLA 16. SENSIBILIDAD (SE) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AGARIZADOS SELECTIVOS DIFERENCIALES EN LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD, TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. MÓVIL INOCULADAS	107
TABLA 17. EXACTITUD (EXA) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AGARIZADOS SELECTIVOS DIFERENCIALES EN LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD, TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. MÓVIL INOCULADAS	108
TABLA 18. VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AGARIZADOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES EN LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD, TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. MÓVIL INOCULADAS	109
TABLA 19. SENSIBILIDAD (SE) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AGARIZADOS SELECTIVOS DIFERENCIALES EN LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD, TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. INMÓVIL INOCULADAS	110

TABLA 20. EXACTITUD (EXA) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AGARIZADOS SELECTIVOS DIFERENCIALES EN LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV5), CALDO TETRATIONATO (TTD, TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LAS CEPAS DE *SALMONELLA* SPP. INMÓVIL INOCULADAS..... 111

TABLA 21. VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AGARIZADOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES EN LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD, TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) PARA LAS CEPAS DE *SALMONELLA* SPP. INMÓVIL INOCULADAS..... 112

TABLA 22. CONCORDANCIA (COEFICIENTE KAPPA Y TEST DE MCNEMAR) ENTRE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS-DIFERENCIALES EN LAS DISTINTAS TÉCNICAS PARA MUESTRAS DE GUANO CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE CON *SALMONELLA* SPP. MÓVILES..... 114

TABLA 23. CONCORDANCIA (COEFICIENTE KAPPA Y TEST DE MCNEMAR) ENTRE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS-DIFERENCIALES EN LAS DISTINTAS TÉCNICAS PARA MUESTRAS DE GUANO CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE CON *SALMONELLA* SPP. (*SALMONELLA* SER. GALLINARUM BIOVARES GALLINARUM- SG- Y PULLORUM -SP-)..... 115

TABLA 24. RECUENTOS DE CEPAS INOCULADAS EN GUANO ESTÉRIL Y PORCENTAJE DE CEPAS INJURIADAS (% CI) PARA AGUA PEPTONA BUFFERADA (APB), CALDO TETRATIONATO DIRECTO (TTD), CALDO TETRATIONATO LUEGO DE PREENRIQUECIMIENTO (TT) Y CALDO TETRATIONATO SEGÚN HAJNA LUEGO DE PREENRIQUECIMIENTO (TTH) POR INOCULACIÓN EN AGAR TRIPTEÍNA DE SOJA (ATS) Y AGAR MACCONKEY (MC). LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO $\pm$ DESVÍO ESTÁNDAR. LAS CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS FUERON *SALMONELLA*. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) CUB 55/10, S. SER. GALLINARUM BIOVAR POUILLORUM (SP) INTA BALCARCE 90-142 Y *E. COLI* (EC).118

TABLA 25. AISLAMIENTO MEDIANTE LOS MÉTODOS MEDIO SEMISÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV), CALDO TETRATIONATO (TTD Y TT) Y CALDO TETRATIONATO HAJNA (TTH) DE LAS CEPAS DE *SALMONELLA*. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) CUB 55/10, S. SER. GALLINARUM BIOVAR POUILLORUM (SP) INTA BALCARCE 90-142 Y *E. COLI* (EC) EN GUANO DE AVES CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE 119

TABLA 26. PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP. EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS EN GALPONES DE GALLINAS DE POSTURA 149

TABLA 27. PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP. EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS EN GALPONES DE POLLOS PARRILLEROS..... 151

TABLA 28. MUESTRAS POSITIVAS AL AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN HÍGADO DE POLLO OBTENIDAS DE MERCADOS RELACIONADOS CON NUEVE FRIGORÍFICOS DE POLLOS EN ENTRE RÍOS	152
TABLA 29. PORCENTAJE DE LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. AISLADOS EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	153
TABLA 30. SEROTIPOS AISLADOS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS EN GRANJAS GALLINAS	154
TABLA 31. PORCENTAJE DE LOS DIFERENTES SEROVARES DE <i>SALMONELLA</i> SPP. AISLADOS EN GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	156
TABLA 32. SEROVARES AISLADOS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS EN GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS	157
TABLA 33. SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. AISLADOS EN MUESTRAS DE HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS OBTENIDOS DE MERCADOS RELACIONADOS CON CUATRO FRIGORÍFICOS DE POLLOS PARRILLEROS (B, D, H, I) EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS	159
TABLA 34. AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	161
TABLA 35. AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS EN GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	163
TABLA 36. SENSIBILIDAD (SE_R), EXACTITUD (EXA_R) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO RELATIVOS (VPN_R) PARA LOS AGARES SELECTIVOS-DIFERENCIALES XILOSA LISINA DESOXICOLATO (XLD), HEKTOEN (HE), XILOSA LISINA DESOXICOLATO CON TERGITOL (XLDT), EF-18, MACCONKEY (MC) Y <i>SALMONELLA-SHIGELLA</i> (SS), UTILIZADOS EN DISTINTAS MUESTRAS PROVENIENTES DE GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS.	165
TABLA 37. CONCORDANCIA ENTRE LOS MEDIOS AGARIZADOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN DISTINTAS MUESTRAS PROVENIENTES DE GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS.....	166

TABLA 38. SENSIBILIDAD (SE_R), EXACTITUD ($EXAR$) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN_R) RELATIVOS PARA LOS AGARES SELECTIVOS-DIFERENCIALES XILOSA LISINA DESOXICOLATO (XLD), HEKTOEN (HE), XILOSA LISINA DESOXICOLATO CON TERGITOL (XLDT), EF-18, MACCONKEY (MC) Y *SALMONELLA-SHIGELLA* (SS) UTILIZADOS EN DISTINTAS MUESTRAS PROVENIENTES DE GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS..... 168

TABLA 39. CONCORDANCIA ENTRE LOS MEDIOS AGARIZADOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP. EN DISTINTAS MUESTRAS PROVENIENTES DE GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS..... 169

TABLA 40. SENSIBILIDAD (SE_R), EXACTITUD ($EXAR$) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO RELATIVOS (VPN_R) Y CONCORDANCIA (COEFICIENTE KAPPA Y PRUEBA DE MCNEMAR) PARA EL AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP. EN MUESTRAS DE HÍGADO DE POLLOS PARRILLEROS RECOLECTADAS DE LOS MERCADOS DE ENTRE RÍOS, PROCESADAS SEGÚN LOS MÉTODOS DE PREENRIQUECIMIENTO PREVIO Y INOCULACIÓN DIRECTA. 170

TABLA 41. SENSIBILIDAD (SE_R), EXACTITUD ($EXAR$) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO RELATIVOS (VPN_R) Y CONCORDANCIA (COEFICIENTE KAPPA Y PRUEBA DE MCNEMAR) PARA EL AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP. EN LOS DOS MÉTODOS EMPLEADOS EN MUESTRAS DE HÍGADO DE POLLOS PARRILLEROS RECOLECTADAS DE LOS MERCADOS DE ENTRE RÍOS, PROCESADAS SEGÚN LOS MÉTODOS DE PREENRIQUECIMIENTO PREVIO Y INOCULACIÓN DIRECTA Y SEMBRADAS EN AGAR LISINA HIERRO MODIFICADO (MLIA) Y AGAR MACCONKEY (MC)..... 171

TABLA 42. RESULTADOS GENERALES DE LA ENCUESTA REALIZADA EN LAS 63 GRANJAS MUESTREADAS. SE INDICA EL NÚMERO DE GRANJAS CON RESPUESTAS AFIRMATIVAS PARA CADA UNA DE LAS PREGUNTAS DEL CUESTIONARIO 173

TABLA 43. RESULTADOS GENERALES DE LA ENCUESTA REALIZADA EN LAS 63 GRANJAS MUESTREADAS. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS EN BASE A LOS 77 GALPONES MUESTREADOS. SE INDICA EL NÚMERO DE GALPONES CON RESPUESTAS AFIRMATIVAS PARA CADA UNA DE LAS PREGUNTAS DEL CUESTIONARIO. 175

TABLA 44. RESULTADOS GENERALES DE LA ENCUESTA REALIZADA EN LAS 93 GRANJAS MUESTREADAS. SE INDICA EL NÚMERO DE GRANJAS CON RESPUESTAS AFIRMATIVAS PARA CADA UNA DE LAS PREGUNTAS DEL CUESTIONARIO. 177

TABLA 45. RESULTADOS GENERALES DE LA ENCUESTA REALIZADA EN LAS 93 GRANJAS MUESTREADAS. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS EN BASE A LOS 176 GALPONES MUESTREADOS. SE INDICA EL NÚMERO DE GALPONES CON RESPUESTAS AFIRMATIVAS PARA CADA UNA DE LAS PREGUNTAS DEL CUESTIONARIO	179
TABLA 46. RESULTADOS DEL ANÁLISIS UNIVARIADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO ($P < 0,15$) PARA LA PRESENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GALPONES DE GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	181
TABLA 47. RESULTADO DEL ANÁLISIS MULTIVARIADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO ($P < 0,05$) PARA LA PRESENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GALPONES DE GALLINAS PONEDORAS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	184
TABLA 48. RESULTADOS DEL ANÁLISIS UNIVARIADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO ($P < 0,15$) PARA LA PRESENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GALPONES DE GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	185
TABLA 49. RESULTADO DEL ANÁLISIS MULTIVARIADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO ($P < 0,05$) PARA LA PRESENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GALPONES DE GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	188
TABLA 50. ORIGEN DE LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) INCLUIDAS EN LOS ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS	204
TABLA 51. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA EN MICROPLACAS DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS (PONEDORAS Y PONEDORAS) E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	210
TABLA 52. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN LA INTERFASE LÍQUIDO-AIRE DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS (PONEDORAS Y PARRILLEROS) E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	211
TABLA 53. MORFOTIPOS DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS (PONEDORAS Y PARRILLEROS) E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	212

TABLA 54. CONCORDANCIA ENTRE LAS TÉCNICAS DE CRISTAL VIOLETA (CV), INTERFASE LÍQUIDO AIRE (ILA), MORFOLOGÍA DE LA COLONIA EN ROJO CONGO (MORFOTIPO) Y EL PRODUCTO COMERCIAL “BIOFINDER” UTILIZADAS PARA LA DETECCIÓN DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS (PONEDORAS Y PARRILLEROS) E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS. PARA LA TÉCNICA DE CV SE CONSIDERÓ COMO UN ÚNICO GRUPO A LAS FUERTEMENTE Y MODERADAMENTE ADHERENTES	214
TABLA 55. VALORES DE ABSORBANCIA EN EL ENSAYO DE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA DE LOS DIFERENTES ENFRENTAMIENTOS DE LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE) Y S. SER. TYPHIMURIUM (ST) CON LAS CEPAS Y SOBRENADANTES DE <i>LENTILACTOBACILLUS KEFIRI</i> CIDCA 8321 (LK) Y <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> CIDCA 83114 (LP) COINCUBADAS Y PREINCUBADAS.	216
TABLA 56. RESULTADOS EN LOS DIFERENTES ENFRENTAMIENTOS DE LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE) Y S. SER. TYPHIMURIUM (ST) CON LAS CEPAS Y SOBRENADANTES DE <i>LENTILACTOBACILLUS KEFIRI</i> CIDCA 8321 (LK) Y <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> CIDCA 83114 (LP) COINCUBADAS Y PREINCUBADAS	217
TABLA 57. ANTIBIÓTICOS EVALUADOS FRENTE A DIFERENTES CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.....	228
TABLA 58. ANTIBIÓTICOS COMERCIALES UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS CONTRA <i>SALMONELLA</i> SPP. DE ACUERDO A SU DOSIS DE USO RECOMENDADA.....	231
TABLA 59. PRODUCTOS DESINFECTANTES CON LAS DOSIS RECOMENDADAS POR EL FABRICANTE Y EL RANGO DE DOSIS PARA SER ENFRENTADOS CON LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM	235
TABLA 60. CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE RESISTENCIA A LOS DESINFECTANTES SOBRE CAMA Y ALUMINIO	236
TABLA 61. PRODUCTOS DESINFECTANTES CON SU RESPECTIVA DOSIS UTILIZADOS EN CAMA Y ALUMINIO EN LOS ENSAYOS CON CONTAMINACIÓN CON <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, Y S. SER. TYPHIMURIUM.....	237
TABLA 62. SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	239

TABLA 63. PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS E ÍNDICE DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A ANTIBIÓTICOS (IRMAS) EN AISLAMIENTOS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	240
TABLA 64. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) FRENTE A ERITROMICINA DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	242
TABLA 65. RESPUESTAS DE SENSIBILIDAD DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIBIÓTICOS COMERCIALES UTILIZADOS EN GRANJAS AVÍCOLAS.....	244
TABLA 66. RESPUESTA DE SENSIBILIDAD DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS	247
TABLA 67. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) NECESARIA DE LOS PRODUCTOS DESINFECTANTES PARA INHIBIR EL 100 % DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS	249
TABLA 68. SENSIBILIDAD DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE), S. SER. TYPHIMURIUM (ST) Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM (SG) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DESINFECTANTES COMERCIALES UTILIZADOS EN GRANJAS AVÍCOLAS Y VIVIENDAS. S=SENSIBLE; R= RESISTENTE	250
TABLA 69. RECUENTOS DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE) Y S. SER. TYPHIMURIUM (ST) PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS SOBRE ALUMINIO ESTERILIZADO EN LOS ENSAYOS DE DESINFECTANTE CON DOSIS 0 % V/V.....	253
TABLA 70. RECUENTOS DE CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> SER. ENTERITIDIS (SE) Y S. SER. TYPHIMURIUM (ST) PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS FRENTE A LAS DIFERENTES DILUCIONES DE LOS DESINFECTANTES SOBRE CAMA DE POLLOS PARRILLEROS ESTERILIZADA.	254

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO EN ANIMALES DURANTE EL AÑO 2017.	54
FIGURA 2. ETAPAS EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS	69
FIGURA 3. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL AISLAMIENTO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN MUESTRAS DE GUANO POR 4 TÉCNICAS DIFERENTES (MSRV, TTH, TT, Y TTD)	90
FIGURA 4. DIAGRAMA DE FLUJO PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE LA COMPETENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. INMÓVIL Y UNA CEPA DE <i>E. COLI</i> EN GUANO ESTÉRIL POR 4 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DIFERENTES	96
FIGURA 5. MAPA DE ENTRE RÍOS. EN VERDE SE DESTACAN LOS DEPARTAMENTOS DONDE SE ENCUENTRAN LAS GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS QUE FUERON MUESTREADAS	128
FIGURA 6. MAPA DE ENTRE RÍOS. EN ROJO SE DESTACAN LOS DEPARTAMENTOS DONDE SE ENCUENTRAN LAS GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS QUE FUERON MUESTREADAS	130
FIGURA 7. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. ...	135
FIGURA 8. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN HISOPADO DE CAMA.....	136
FIGURA 9. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN MUESTRAS PROVENIENTES DE AVES MUERTAS.....	138
FIGURA 10. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN GUANO	139
FIGURA 11. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN HUEVOS	140
FIGURA 12. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN POOL DE HISOPADOS CLOCALES DE AVES VIVAS.....	141
FIGURA 13. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN HÍGADO DE POLLOS PARRILLEROS RELACIONADOS A FRIGORÍFICOS	142
FIGURA 14. ETAPAS EN LA DETERMINACIÓN BIOPELÍCULAS POR LA TÉCNICA DE CRISTAL VIOLETA	206
FIGURA 15. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA EN LA INTERFASE LÍQUIDO-AIRE EN TUBO	211

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se difundieron parcialmente a través de las siguientes publicaciones:

Capítulos de libros

- Bueno D. J., Soria M. C., Soria M. A., **Procura F.**, Rodríguez F. I. and Godano E. I. 2017. Egg Production Systems and *Salmonella* in South America. In Producing Safe Eggs. Microbial Ecology of *Salmonella*. Páginas 87-110. Edited by Steven C. Ricke and Richard K. Gast. El sevier, Iac. Cambridge.
- Bueno, D. J., Soria, M. A., Genta, G., **Procura, F.**, y Rodríguez, F.I. 2016. *Salmonella* spp. En cama de aves. En Cama de pollos en Entre Ríos, aportes para su uso y manejo. Copilador J.M. Gange. Página. Páginas 19-35. Ediciones INTA, Argentina.
- **Procura F.** and Bueno D. J. 2015. *Salmonella's* Contamination in Egg. In Food Microbiology Fundamenentals, Challenges and Health Implications. Páginas 87-116. Edited by Elaine Perkins. Nova Publishers, New York.

Publicaciones con referato

- Merino, L., **Procura, F.**, Trejo, F. M., Bueno, D. J., & Golowczyc, M. A. 2019. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. Food Research International, 119, 530-540.
- **Procura F.**, Bueno, D.J., Bruno, S.B and Rogé, A.D. 2019. Prevalence, antimicrobial resistance profile and comparison of methods for the isolation of *Salmonella* in chicken liver from Argentina. Food Research International, 119, 541-546.
- Rodríguez, F. I., **Procura, F.**, & Bueno, D. J. 2018. Comparison of 7 culture methods for *Salmonella* serovar Enteritidis and *Salmonella* serovar Typhimurium isolation in poultry feces. *Poultry Science*, 97(11), 3826–3836.
- Bueno, D.J., López, N., Rodríguez, F.I., y **Procura, F.** 2016. Producción de pollos parrilleros en países sudamericanos y planes sanitarios nacionales para el control de *Salmonella* en dichos animales. Revista Agronómica del Noroeste Argentino, 36:11-37.

Publicaciones sin referato

- Makaruk, J.N.; **Procura, F.** y D.J. Bueno. 2018. Planes Nacionales para el control de *Salmonella* en pollos de engorde de Argentina, Unión Europea y Estados Unidos parte I. Plagas, ambiente y salud Año II N°9: 42-48.
- Bueno, D. J y **Procura, F.** 2015. Salmonelosis en aves: diagnostico, prevención y control. Negocios de Aviculturas. Año 12, Número 63, 2015. ISSN 1853-600X.
- **Procura, F.** y Bueno, D. J. 2014. El paso de pre-enriquecimiento en el aislamiento de *Salmonella*. Negocios de Aviculturas. Año 11, Número 57, 2014. ISSN 1853-600X.

ABREVIATURAS

AE	Aceites esenciales
APT	Agua de peptona tamponada
ATCC	American Type Culture Collection (por sus siglas en inglés)
CDC	Center for Disease Control and Prevention (por sus siglas en inglés)
CE	Comunidad Europea
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (por sus siglas en inglés)
CTS	Caldo tripteína de soja
CUB	Concepción del Uruguay Bacteriología
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EFSA	European Food Safety Authority (por sus siglas en inglés)
EPS	Exopolisacarido
Esp	Especificidad
EXA	Exactitud
FAO	Food and Agriculture Organization (por sus siglas en inglés)
FDA	Food and Drugs Administration (por sus siglas en inglés)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IRMAs	Índice de Resistencia Múltiple a los Antibióticos
LIA	Lysines Iron Agar (por sus siglas en inglés)
MC	Agar MacConkey
MDR	Multidrug Resistance (por sus siglas en inglés)
MSRV	Medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OIRSA	Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
OR	Odds Ratio (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PDR	Pandrug Resistance (por sus siglas en inglés)
QAC	Quarternary Ammonium Compound (por sus siglas en inglés)
SE	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovariedad Enteritidis
Se	Sensibilidad
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SG	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovariedad Gallinarum biovar Gallinarum
SIM	Agar sulfuro-indol-movilidad

SP	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovariedad Gallinarum biovar Pullorum
SS	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
ST	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovariedad Typhimurium
TSI	Triple sugar iron agar (por sus siglas en inglés)
TT	Caldo tetrionato
USDA	United States Department of Agriculture (por sus siglas en inglés)
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WHO	World Health Organization (por sus siglas en inglés)
XDR	Extensively Drug Resistance (por sus siglas en inglés)
XLD	Agar xilosa lisina desoxicolato

RESUMEN

Salmonella spp. representa un importante problema de salud pública mundial y es una amenaza emergente de zoonosis bacteriana en la industria avícola. Los lotes de aves infectadas son uno de los más importantes reservorios de *Salmonella enterica* que pueden ser transmitidas al ser humano a través de la cadena alimentaria. Ante las crecientes presiones de las autoridades sanitarias, es crucial implementar medidas de control para salvaguardar la salud del consumidor. Por ello, el objetivo general de este trabajo de tesis fue generar información sobre la susceptibilidad de las cepas regionales de *Salmonella enterica* frente a diversos agentes antimicrobianos, seleccionados por sus diferentes mecanismos de acción y su uso frecuente en la producción avícola nacional. Para ello, se determinó la prevalencia de bacterias del género *Salmonella* y de las serovariedades Enteritidis (SE), Typhimurium (ST) y Gallinarum (SG) en granjas de gallinas ponedoras y pollos parrilleros comerciales de las zonas de mayor concentración avícola de la provincia de Entre Ríos. Además, se caracterizaron los aislamientos de SE, ST y SG en cuanto a la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos, capacidad de producir biopelículas y se evaluó la eficiencia de bacterias ácido lácticas probióticas seleccionados en la prevención de la formación de biopelículas en las cepas de *Salmonella* spp. que se aislaron en este estudio. Se estudiaron muestras ambientales (guano, hisopado de cama, alimento, y huevos) y animales (hisopados cloacales de aves vivas y órganos e hisopados cloacales de aves muertas) de 63 granjas de gallinas de postura y 93 granjas de pollos parrilleros. A su vez, se obtuvieron del mercado minorista 666 hígados de pollos para consumo. Se consideró como contaminada a aquella granja en la que al menos en una de las muestras examinadas hubiera sido aislada *Salmonella* spp. La prevalencia de esta bacteria en granjas de gallinas de postura fue de del 46 % (29/63). No obstante, sobre un total de 1.807 muestras analizadas para aislamiento de *Salmonella* spp., sólo el 5 % de las mismas (93) fueron positivas a esta bacteria. Las muestras de guano fueron las que presentaron mayor porcentaje de aislamientos, con un valor del 19 % (29/154). Se obtuvieron un total de 234 aislamientos; de los cuales fueron identificadas 64 como SE, 2 como ST y 36 como SG, obteniendo así porcentajes de aislamiento por granja de 14, 2 y 6 % para los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum, respectivamente. Del mismo modo la prevalencia de *Salmonella* spp. en granjas de pollos parrilleros fue del 62 % (58/93). A su vez, sobre un total de 1.093 muestras analizadas para aislamiento de *Salmonella* spp., sólo el 11 % de las mismas (123) fueron positivas a esta bacteria. Las muestras de hisopado de cama fueron las que presentaron mayor porcentaje de aislamiento con un valor del 36 % (64/176). Se obtuvieron un total de 259 aislamientos, los cuales fueron identificados 30 como SE, 10 como ST y 14 como SG, obteniendo así porcentajes de aislamiento por granja de 13, 3 y 1 % para los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum, respectivamente. En referencia a los hígados de pollos para consumo, de las 666 muestras procesadas, 32 (4,8 %) fueron positivas al aislamiento de *Salmonella* spp. Se aislaron un total de 50 cepas, de las cuales 9 (18 %) y 2 (4 %) fueron identificadas como SE y ST, respectivamente.

En la caracterización de los aislamientos se incluyeron las 169 cepas de *Salmonella* spp. tipificadas como SE (105), ST (14) y SG (50). La totalidad de las cepas resultaron resistentes a la eritromicina y fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos

ensayados. Solo 16 cepas de SG presentaron multirresistencia (MDR). Por otro lado, los aceites esenciales de orégano y espartillo lograron inhibir el 100 % y 97 % de las cepas, respectivamente, mientras que el 81 % de las cepas resultaron ser resistentes al aceite esencial de romero. De 17 productos desinfectantes, en 16 de ellos se comprobó que la dosis propuesta por el fabricante fue suficiente para inhibir el 100 % de las cepas ensayadas. Asimismo, se estudió la producción de biopelículas por diferentes técnicas y condiciones, encontrando consistencia en los resultados entre ellas. Un total de 88 cepas fueron fuerte o moderadamente adherentes en el ensayo de tinción con cristal violeta y produjeron biopelícula en la interfaz líquido-aire en 5 o menos días, mostrando el morfotipo RDAR, lo que indicó la presencia de fimbrias curli y celulosa. Se demostró la capacidad de las bacterias ácido lácticas y sus sobrenadantes para modificar la formación de biopelículas, con las cepas de SE disminuyendo significativamente la formación de biopelículas cuando se realizaron ensayos de preincubación y coincubación con *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. plantarum* CIDCA 83114, mientras que las cepas de ST mostraron diferencias en la formación de biopelículas solo cuando se enfrentaron a *L. kefir* CIDCA 8321. Sin embargo, el sobrenadante de cultivo libre de células de *L. plantarum* CIDCA 83114 fue capaz de disminuir la formación de biopelículas en el serotipo Enteritidis.

El presente trabajo de tesis aporta datos de prevalencia de *Salmonella* spp. en granjas de gallinas de postura, de pollos parrilleros e hígados de pollo para consumo en la zona de mayor densidad de granjas de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Además, detalla información referida a la caracterización de las cepas de SE, ST y SG en cuanto a la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos (antibióticos, desinfectantes y aceites esenciales) y producción de biopelículas, así como el efecto de bacterias ácido lácticas en la prevención de la formación de biopelículas.

Palabras claves: *Salmonella* spp., Prevalencia, Antimicrobianos, Biopelículas, Bacterias ácido lácticas.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN ARGENTINA

En el último medio siglo, en los sectores de producción de carne y huevos de la industria avícola mundial se ha asistido a un incremento significativo de la productividad de las poblaciones de aves de corral modernas. Las sinergias son consecuencia de los progresos realizados en todas las actividades principales relacionadas con el manejo y alojamiento de las aves de corral, la nutrición y la formulación de raciones alimenticias, la aplicación de los conocimientos sobre genética en los programas de cría comercial y un mejor diagnóstico y control de las enfermedades avícolas (FAO, 2013).

La importancia de la avicultura en la mesa del argentino es significativa, donde el huevo y pollo representan aproximadamente el 50 % de la proteína que se consume en ese país (Secretaría de Comunicación, 2020). La carne de pollo es una de las carnes más consumidas en Argentina. En el año 2023, la Industria Avícola Argentina ha ofrecido al mercado interno una cifra cercana a los 45,9 kg/habitante/año (SENASA, 2023). En Argentina, existen alrededor de 5.230 establecimientos avícolas; 2.704 se dedican a la producción de pollos parrilleros, 1.017 a la producción de huevos, y el 19,7 % restante a la reproducción, incubación, recría de las diferentes líneas genéticas y otros (SENASA, 2017). La población promedio de aves industriales en el país es de 139 millones, de las cuales un 71,3 % corresponde a pollos de engorde, un 27 % a gallinas de postura, un 1,6 % a reproductores padres y abuelos de ambas líneas genéticas y el resto a producciones no industriales. Las áreas de producción avícola nacionales se concentran en mayor proporción en las provincias de Entre Ríos 47 % y Buenos Aires 30 %. Le siguen Santa Fe 7 %, Córdoba 6 %, y Mendoza 3 % (Mair, 2023). La faena de las aves se lleva a cabo en las 97 plantas de faena de aves registradas en la “Dirección Nacional de Control Comercial Agropecuario”, de las cuales 55 cuentan con habilitación de SENASA y 42 con habilitación provincial y/o municipal. La faena de aves habilitada por SENASA se distribuyó mayoritariamente en las provincias de Entre Ríos (50,6 %) y Buenos Aires (35,2 %) y en menor medida, en Santa Fe (4,7 %), Córdoba (4,6 %) y Río Negro (2,2 %). El 2,7 % restante se reparte entre las provincias de Mendoza, Salta, Jujuy y La Rioja (SENASA, 2023). Las exportaciones de carne aviar y subproductos del año 2022 totalizaron 227,2 mil toneladas por un valor de 384,1 millones de U\$S FOB (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023). Las líneas genéticas utilizadas por las empresas argentinas en la producción de pollo de engorde son Cobb, Ross, Arbor Acres y Hubbard (Ruiz, 2020).

Del mismo modo, la producción de huevo en Argentina se encuentra concentrada principalmente en las provincias de Buenos Aires (40 %) y Entre Ríos (27 %) seguido por Córdoba (9 %), Mendoza (5 %) y Salta (4,5 %). La producción de huevos demandó 1,5 millones de toneladas de maíz y 500.000 de soja en 2022. Además, empleó a 18.000 personas en forma directa y 12.000 de manera indirecta (Agrofy News, 2023). Generalmente, las líneas genéticas de aves de postura utilizadas por los productores son Hy-Line, Lohmann y H&N, que son importadas de otros países (Ruiz, 2020). Además, se cuentan con líneas genéticas propias desarrolladas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que son ponedoras autosexantes conocidas como Negra INTA y Rubia INTA. Las mismas son utilizadas para una avicultura con fines semi-intensiva, de

postura a piso (Dottavio y Di Masso, 2010). Además, existe el pollo INTA Campero para disponer de una población doble propósito con adecuados niveles productivos de carne y huevos y de rusticidad para ser utilizada en sistemas semi-intensivos (Canet *et al.*, 2021). En cuanto al tipo de alojamiento de las gallinas y la tecnología adoptada, en Argentina conviven distintos sistemas de producción, entre los clásicos, antiguos, abiertos, y los galpones automáticos. Incluso la mayoría de las granjas que tienen automatización, también tienen parte de los galpones antiguos (Rodríguez *et al.*, 2016).

Si bien la estacionalidad de la producción produce cierta volatilidad, la tendencia de la producción de huevos en cáscara es claramente creciente. Durante el periodo 2000-2001 la producción se mantuvo relativamente estable con un volumen promedio de 5.900 millones de huevos. La crisis económica del año 2002 provocó una caída del 18 % en la producción, registrándose el mínimo del periodo bajo análisis (4.557 millones de huevos). El crecimiento sostenido de la producción comenzó a partir del 2003, año en que se abrió el mercado externo para el huevo en cáscara, al mismo tiempo que se incrementó la cantidad de huevos destinados a la industria de escala nacional. El periodo más expansivo en la producción se observó entre 2003 y 2013, registrándose una tasa de crecimiento anual promedio del orden del 9 % con una producción promedio de 8.414 millones de huevos frescos. A partir de 2014 y hasta el año 2020 se produjo un crecimiento promedio de la producción del 3 % anual (se pasó de 11.774 a 13 862 millones de huevos en cáscara), observándose una disminución del 3,5 % de la producción en el año 2018 producto de la reducción de las existencias de aves de postura. La producción de casi catorce mil millones de huevos frescos marcó, a fines del año 2020, un récord histórico (Paolilli *et al.*, 2021). En cuanto a las exportaciones, la industria del huevo exportó 1.653 toneladas de huevo industrializado, 1.196 toneladas de albúmina de huevo y 1.589 toneladas de yema de huevo. No hubo importaciones de huevos y sus derivados durante el 2018 (Secretaría de Agroindustria, 2018).

2. PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS

Con 22.000 empleos directos generados en el sector privado, la cadena de valor avícola entrerriana es una de las principales actividades económicas y sociales de la provincia, y se destaca por su participación en producción y comercialización de diversos productos en el ámbito nacional e internacional (Ministerio de Producción, Turismo y Desarrollo Económico de Entre Ríos, 2020). En la provincia de Entre Ríos, la producción de aves se encuentra distribuida por casi todo el territorio, concentrándose el 68 % de las granjas en los departamentos de Uruguay, Colón, Gualeguaychú y Gualaguay; el 25 % en los departamentos Paraná, Diamante, Tala, Nogoyá, Villaguay y el 7 % en los departamentos San Salvador, Concordia, Federación, La Paz, Federal, Victoria e Islas del Ibicuy. Se ubican nuevos asentamientos de granjas en sitios que ofrecen importantes ventajas de bioseguridad, como lo son montes bajos y zonas de baja concentración poblacional avícola. Del total de granjas existentes en la provincia, el 87 % corresponde a producción de carne, el 7,5 % a la producción de huevos de consumo, y el resto corresponde a granjas de incubación, recría, reproducción, entre otras (Ríos *et al.*, 2019).

La producción de pollos parrilleros es realizada por empresas integradoras, que poseen planteles de reproducción (abuelos y padres), huevos fértiles, incubación, pollitos, alimento balanceado, plantas procesadoras de aves, además de ejecutar su comercialización. La crianza del pollo está contratada como un servicio; algunas empresas poseen granjas propias e integradas, otras poseen todo integrado. Este tipo de integración corresponde al 95 % de la producción avícola de carne (Ministerio de Producción de Entre Ríos, 2012; SENASA, 2015). La producción de huevo se encuentra más automatizada que la de la carne. Por una parte, hay granjas independientes que cuentan con instalaciones propias que se proveen de las aves y el alimento, que destinan parte de la producción al mercado minorista y el resto lo destinan al consumo mayorista o a la producción de ovoproductos. Por otra parte, existe cierta integración en algunas empresas donde la cadena se encuentra altamente concentrada (Filadoro, 2015).

3. RIESGOS SANITARIOS EN GRANJAS

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades aviares oscilan entre el 10 y 20 % del valor bruto de la producción del sector avícola de los países desarrollados y probablemente sean más elevadas en los países en desarrollo (FAO, 2013). Distintos factores de riesgo pueden estar implicados en la contaminación microbiológica de las aves (Gama *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2012). Entre los más importantes, están el movimiento de las personas encargadas de las granjas, la exposición a roedores, los insectos, los animales domésticos, aves silvestres, el agua y el alimento. Las aves pueden infectarse con bacterias del género *Salmonella* debido al consumo de alimento balanceado contaminado, cuyos ingredientes pueden ser de origen animal (expeller y harina de carne, hueso, pescado, entre los más importantes) o vegetal (maíz, expeller, harina y poroto de soja), siendo los ingredientes de origen animal la principal fuente de contaminación (Ruiz, 2016).

Los lotes de aves infectadas son uno de los más importantes reservorios de *Salmonella enterica* que pueden ser transmitidas al ser humano a través de la cadena alimentaria. Los productores avícolas están preocupados por las crecientes presiones de las autoridades sanitarias, debido a la implicancia de estas bacterias en la salud pública, demandando instaurar medidas de contralor para proteger al consumidor de las enfermedades transmitidas por la carne y los huevos (Gast y Porter, 2020). La contaminación de la carne por *Salmonella* spp., ya sea la carcasa del ave o los trozados y subproductos puede tener base en el mismo procesamiento en la planta de faena por contaminación cruzada, con el agua de la planta, envases contaminados, roedores, moscas, falta de higiene y los mismos operadores que pudieran comportarse como portadores de *Salmonella* spp. Otra posible fuente es la misma granja de origen de la cual provienen las aves que se faenan y, en particular, la cama y el ambiente del galpón, que pueden constituirse en la más importante fuente de contaminación de la planta y por tanto del producto final. Cuando *Salmonella* spp. está presente en el ambiente de la granja es difícil de eliminar debido a que permanece en la materia fecal y el ambiente. La

contaminación bacteriana de los huevos frescos puede darse por dos vías: transovárica (transmisión vertical) o a través de la cáscara (transmisión horizontal). La transmisión vertical se considera la principal vía de contaminación por *Salmonella* spp. y resulta la más difícil de combatir, mientras que la transmisión horizontal puede disminuirse eficazmente mediante medidas de limpieza y desinfección del entorno (Suárez y Mantilla, 2000; Gast y Porter, 2020).

4. GÉNERO *SALMONELLA*

Salmonella corresponde al nombre del género de una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y se la puede encontrar tanto como comensal o patógeno en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales (Caffer y Terragno, 2001). Las enfermedades producidas por *Salmonella* spp. se denominan salmonelosis y presentan una variación en la morbilidad y mortalidad según la especie afectada y los huéspedes intervinientes (Tunes y Vigo, 2007).

Este género bacteriano comprende bacilos Gram negativos, de pequeñas dimensiones (0,7-1,5 µm de ancho x 2-5 µm de largo), rectos, la mayoría móviles (con flagelos peritricos), con la excepción de la serovariedad Gallinarum. Las colonias son de 2-4 mm de diámetro. Son aeróbicos facultativos, reducen los nitratos a nitritos, en general fermentan la glucosa con producción de gas, producen sulfuro de hidrógeno y son capaces de desarrollarse en medios de cultivos que sólo disponen de citrato como única fuente de carbono, no hidrolizan el indol ni la urea, no fermentan azúcares como lactosa, sacarosa, salicina e inositol y descarboxilan la lisina y ornitina (Mølbac *et al.*, 2006). Sin embargo, existe un 1 % de las cepas de *Salmonella* spp. que son fermentadores lentos de lactosa (Edwards y Ewing, 1986) y algunas también fermentan sacarosa (Gonzalez, 1966). El género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones a través de los años en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Sin embargo, todavía se siguen utilizando muchos de los métodos descriptos y desarrollados por Edwards y Ewing en la década del 40, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae (Caffer y Terragno, 2008). La nomenclatura del género ha evolucionado desde el concepto inicial -un serotipo, una especie propuesto por Kauffman- sobre la base de la identificación serológica de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), respectivamente. (Brenner *et al.*, 2000).

Estudios del ADN mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La especie llamada *Salmonella subterranea* no pertenece al género *Salmonella*. Por su parte, *S. enterica* tiene seis subespecies (a veces presentadas como subgrupos bajo numeración romana): *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespecie, a su vez, se conforma de diversas serovariedades o serotipos, habiéndose identificado hasta la fecha 2.659 (**Tabla 1**). La más importante y numerosa es *S. enterica*

subsp. *enterica* (o subgrupo I), que comprende 1.586 serovariedades divididos en cinco serogrupos (según la antigua designación de antígenos polisomáticos): A, B, C, D y E (Grimont y Well, 2007; OMSA, 2022). Por otro lado, el análisis de las secuencias de genes de ARNr 16S indica que *Salmonellae* pertenecen a Gammaproteobacteria, junto a otras Enterobacterias y *Pseudomonas* sp. *S. enterica* y *S. bongori* fueron separadas por análisis de ADNr 16S y se encontró que están muy relacionados a *E. coli* y al complejo *Shigella* por los análisis de ADNr 16S y 23S (Fukushima, 2002; William *et al.*, 2010; Hata *et al.*, 2016).

Tabla 1. Número de especies, subespecies y serovariedades del género *Salmonella* (OMSA, 2022)

Especie de <i>Salmonella</i>	Subespecie de <i>Salmonella</i>	N° de serovariedades
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1.586
	<i>salamae</i> (II)	522
	<i>arizonae</i> (IIIa)	102
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	338
	<i>houtenae</i> (IV)	76
	<i>Indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i> (V)	-	22
Total		2.659

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez. Las serovariedades de las otras subespecies tienen mayor probabilidad de presentarse en animales poiquilotermos (de sangre fría) y en el ambiente, pero a veces se les asocia con la enfermedad en humanos (OMSA, 2008).

La identificación de una bacteria como *Salmonella* spp. no es dificultosa, pero existen dos problemas; el primero es el complejo análisis antigénico y fagotipado necesario para identificar las cepas con suficiente detalle para ser de ayuda en la trazabilidad de la fuente de infección. La segunda es como denominar a las cepas (por el nombre o fórmula antigénica) en el informe que se realiza para los clínicos y para los oficiales de salud pública (Barrow y Feltham, 1993). Como las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres no siguen las reglas del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias, de manera que sus nombres se deben escribir en letras romanas (no itálicas) y con mayúscula; por ejemplo, el nombre completo de la llamada *Salmonella* Typhimurium es: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad Typhimurium. Como este nombre es muy largo, a los fines prácticos se usa directamente *Salmonella* ser. Typhimurium (ST).

Las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes y a *Salmonella bongori*, de baja incidencia en patología humana o animal, se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la fórmula antigénica, por ej: *Salmonella* subesp. IV 50: b : - (*Salmonella enterica* subesp. *houtenae* 50:b : -). Los nombres de todas las

serovariedades están contenidos en el Esquema de White-Kauffmann-Le Minor (Grimont y Well, 2007). La actualización de ese esquema es responsabilidad del Centro de Referencia e Investigación de *Salmonella* de la Organización Mundial de la Salud (WHO-Salm), perteneciente al Instituto Pasteur de París.

La subdivisión de las serovariedades se puede basar en los biovares, fagovares, en la producción de, o sensibilidad a bacteriocinas y sobre la resistencia a antibióticos. Los biovares presentan diferentes patrones de fermentación de azúcares mostrados por cepas de la misma serovariedad. Esto está determinado genéticamente por la presencia o ausencia de enzimas. Por ejemplo, los biovares Gallinarum (SG) y Pullorum (SP) de la serovariedad Gallinarum. Por su parte, los fagovares están determinados por la sensibilidad de los cultivos a series de bacteriófagos en diluciones apropiadas (Grimont y Weill, 2007).

4.1. *SALMONELLA* SPP. Y HOSPEDADORES

Desde el punto de vista de los hospedadores a los que infecta, *Salmonella* spp. se pueden clasificar en tres grupos (Caffer y Terragno, 2001):

- ✓ Las que no tienen preferencia por ningún hospedador en particular, por lo que infectan tanto al hombre como a distintas especies de animales. En este grupo se encuentran todas las serovariedades de *S. enterica* causantes de zoonosis.
- ✓ Las que sólo están adaptadas al hombre y nunca causan enfermedad en los animales: *S. ser. Typhi*, *S. ser. Paratyphi A* y *S. ser. Paratyphi C*. Se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra.
- ✓ Las que sólo están adaptadas a una determinada especie animal y rara vez causan enfermedad en el hombre: *S. ser. Abortusovis* en ovinos; *S. ser. Abortusequi* en equinos y SG y SP en aves.

Por su parte, las infecciones de las aves con *Salmonella* spp. pueden agruparse en tres categorías. La primera se refiere a las infecciones con una serovariedad inmóvil con sus dos biovares: SG y SP. Por lo general, estos biovares son específicos de huésped para las especies aviares. La pulorosis, originada por SP, es una enfermedad aguda septicémica de pollos y pavipollos. La tifosis aviar, causada por SG, es una enfermedad septicémica aguda o crónica que afecta con mayor frecuencia aves adultas. Estas dos enfermedades han causado graves pérdidas económicas a los productores avícolas y han hecho que se pongan en práctica extensos programas de control y de erradicación (Gast, 2008).

Otro tipo de infección es la producida por un grupo de serovariedades móviles de *Salmonella* spp., referido de manera colectiva como *Salmonella* paratíficas, que son las principales causantes de enfermedades alimenticias en humanos y de zoonosis. Aunque son muy comunes, las infecciones paratíficas de las aves rara vez causan enfermedades sistémicas agudas, excepto en aves jóvenes muy susceptibles sometidas a condiciones de estrés. Con mayor frecuencia, las infecciones en pollos y pavos por *Salmonella* paratífica se caracterizan por la colonización asintomática del aparato intestinal, algunas

veces con persistencia hasta el sacrificio, lo cual permite la contaminación de los cadáveres. Algunas serovariedades, en especial *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad Enteritidis (SE), pueden depositarse en el contenido de huevos limpios e intactos; por lo que el manejo inapropiado de los alimentos antes del consumo puede permitir la multiplicación de *Salmonella* spp. a concentraciones capaces de originar enfermedades gastrointestinales graves en los consumidores humanos (Gast, 2008). Otras serovariedades de importancia para las aves y el humano son: *S. ser. Heidelberg*, *S. ser. Kentucky*, ST, y *S. ser. Braenderup* (Gast, 2013). Las serovariedades de *Salmonella* spp. causantes de zoonosis constituyen un tema prioritario para la salud pública y el rol de los alimentos en su diseminación debe ser seriamente considerado por la industria alimenticia para ejercer el control de estos microorganismos (Bell y Kyriakides, 2002). En particular, un gran número de ellas han sido asociadas con el consumo de carne de pollo, huevos y derivados (Foley *et al.*, 2008).

El tercer tipo de infección es la causada por *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*, que con anterioridad se llamaba *Arizona hinshawii*. Este microorganismo, aunque bioquímicamente distinto, causa una enfermedad que no se distingue en sus aspectos clínicos de otras infecciones por *Salmonella*. La arizonosis es de particular importancia económica en pavos (Gast, 2008).

Solo el 10 % de las *Salmonella* spp. existentes han sido aisladas de las aves de corral. Además, un subconjunto aún más pequeño de las mismas representa la gran mayoría de los aislamientos en este tipo de aves. La distribución de las serovariedades de esta bacteria de fuentes avícolas varía geográficamente y cambia todo el tiempo, aunque varias de ellas se suelen encontrar en una alta incidencia (Gast y Porter, 2020). En los últimos años, la gravedad de los problemas en aves por *Salmonella* spp. se ha expandido de manera considerable. En el pasado, la principal motivación era controlar las infecciones por esta bacteria en las aves, con el fin de disminuir las pérdidas por enfermedad. En la actualidad, la salud pública, las presiones políticas y demandas por parte del consumidor han originado de manera creciente la prevención para evitar la transmisión por los alimentos a los humanos, como una prioridad urgente para los productores avícolas (Gast, 2013).

4.2.DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP.

El éxito en la detección de *Salmonella* spp. depende de la elección de un procedimiento de muestreo representativo y del método de detección utilizado (Chacana y Terzolo, 2003; Carrique-Mas y Davies, 2008). Las muestras pueden ser las aves (hisopado cloacal, sangre, órganos), sus productos (huevo) y/o el ambiente (polvo, cama, agua, alimento, guano). Existen diversos métodos para la detección de *Salmonella* spp. en distintas matrices, los métodos rápidos y los de cultivo. El surgimiento de nuevas tecnologías y la tendencia global de la industria alimenticia por mejorar y establecer mejores controles durante el proceso de elaboración y transporte de los productos hasta llegar al consumidor han estimulado el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico

microbiológicos orientados a garantizar la inocuidad alimentaria y a optimizar los procesos de vigilancia epidemiológica, disminuyendo los tiempos de detección del agente patógeno y aumentando la especificidad y sensibilidad de las técnicas. En general, estos ensayos pueden ser agrupados en tres categorías: métodos inmunológicos, ensayos basados en el ácido nucleico y biosensores (Gonzalez Pedraza *et al.*, 2014).

4.2.1. Métodos inmunológicos

Se han desarrollado una gran variedad de ensayos con utilización de anticuerpos y formatos basados en inmunoquímica (métodos serológicos). Los resultados obtenidos siempre son considerados como presuntos positivos y se hace necesario la confirmación por métodos tradicionales. Entre las técnicas se encuentra los ensayos de aglutinación (entre ellos, la aglutinación rápida en placa), ensayos de inmunoprecipitación e inmunoenzimáticos como el ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima) o el ensayo de flujo lateral (LFAs), y la técnica de inmunoseparación magnética (ISM). La prueba de ELISA se fundamenta en la detección de los antígenos somáticos de superficie y antígenos flagelares en cada serovariedad por el uso de anticuerpos unidos de manera específicas a un antígeno determinado. Una modificación de la técnica de ELISA es LFAs o ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, método que emplea una membrana de nitrocelulosa en la cual se inmoviliza una proteína, por lo general un anticuerpo o un antígeno. Por su parte, la ISM es aplicada para capturar, separar, concentrar y purificar, en presencia de un campo magnético, antígenos solubles, ácidos nucleicos o microorganismos viables a partir de diferentes matrices. La eficiencia de la técnica está determinada por la cantidad y calidad de la microbiota asociada, generándose mayor número de uniones inespecíficas entre mayor sea esta en el momento de la inmunocaptura, además, estas técnicas de concentración al ser optimizadas para una matriz determinada o microorganismo pueden no ser aplicables para otros alimentos (Gonzalez Pedraza *et al.*, 2014). Por otra parte, en general, la aglutinación rápida en placa (ARP) se realiza con suero, y permite detectar infección por SG y SP (Shivaprasad, 2003). Como SE posee el mismo antígeno somático del grupo D que SG y SP, la prueba de sangre completa y otras relacionadas pueden utilizarse en el diagnóstico de la infección, pero la sensibilidad es baja. Esta prueba está incluida como prueba oficial en aves reproductoras de distintos países (OMSA, 2022). Con frecuencia, hay títulos de anticuerpos séricos detectables mucho tiempo después de que se ha eliminado *Salmonella spp.* de los tejidos y ha cesado la diseminación por heces. Los anticuerpos depositados en yemas de huevo, también se pueden utilizar para detectar aves infectadas con *Salmonella* paratíficas (Gast y Porter, 2020).

4.2.2. Métodos basados en el ácido nucleico

Entre las técnicas moleculares aplicables a la detección de *Salmonella spp.*, la más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain*

reaction, PCR), cuyo objetivo principal es la multiplicación *in vitro* de uno o varios segmentos de ADN por acción una enzima ADN polimerasa, ADN dependiente termoestable. Sin embargo, se presentan muchas variantes de este método como la PCR múltiple y la PCR en tiempo real (RT-PCR o qPCR). Además, se ha implementado junto con técnicas como la hibridación de ADN, el uso de biochips y de enzimas de restricción, entre otras, que facilitan el diagnóstico microbiológico molecular de patógenos en diferentes matrices. En el caso de los alimentos o muestras ambientales, la técnica de PCR se realiza después de una etapa previa de enriquecimiento de la muestra, demostrándose una alta probabilidad de detectar un bajo número de células. Así, el diagnóstico molecular por la técnica de PCR se puede combinar con otros métodos, pruebas microbiológicas tradicionales, sondas fluorescentes, ISM, filtración, antes de cada ensayo o mediante el previo enriquecimiento selectivo (Gonzalez Pedraza *et al.*, 2014, OMSA, 2022). Existen técnicas de PCR para detectar *Salmonella* spp. (Soria *et al.*, 2012), SE (Agron *et al.*, 2001), ST (Lim *et al.*, 2003), SG y SP (Batista *et al.*, 2016).

4.2.3. Métodos microbiológicos tradicionales

Los métodos microbiológicos tradicionales para la detección de *Salmonella* spp. (cultivo) no van encaminados al conteo de esta bacteria. Se considera una técnica cuyo resultado se expresa cualitativamente, determinando su presencia o ausencia en diferentes matrices (Gonzalez Pedraza *et al.*, 2014; OMSA, 2022). En casos de monitoreo, el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en una muestra se requieren 5 etapas (SENASA, 2002). La primera es la de preenriquecimiento (medios de cultivo como agua de peptona tamponada, caldo tripteína de soja con o sin hierro, o caldo lactosado, entre otros) para permitir que un escaso número de *Salmonella* spp. se multipliquen sin que mueran por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento selectivo, y/o ayudar a la recuperación de las células que presentan daños subletales, ocasionados por procesos como la congelación, el calentamiento, la exposición a sustancias microbicidas o a la desecación (OMSA, 2022). Luego de una incubación de 6-24 h a 37°C, las muestras se inoculan en medio de enriquecimiento selectivo, que pueden tener diferentes ingredientes (**Tabla 2**).

Los medios de enriquecimiento selectivo pueden ser líquidos (diferentes tipos de caldos tetraciónatos, caldos selenitos, caldo Rappaport-Vassiliadis) ó semisólidos (medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado-MSRV-), donde se incuban a 37 o 41,5-42 °C, según el caso con o sin el agregado de antibióticos, como la novobiocina. Esta última se utiliza para inhibir bacterias como *Proteus* sp. Este paso disminuye la concentración de los microorganismos competidores y aumenta o mantiene estable la población de la bacteria de interés (Entis, 2002). Para el caso del medio semisólido, las bacterias móviles crecen radialmente y forman un halo de crecimiento. Si *Salmonella* spp. móviles están presentes en la muestra, las mismas serán dominantes en el extremo del halo (Busse, 1995), desde dónde pueden ser selectivamente aisladas. Luego de la incubación, se inoculan en estrías por agotamiento en 2 a 3 placas de Petri con medios de cultivos

sólidos selectivos- diferenciales (agar verde brillante; agar Mac Conkey, agar EF-18, agar xilosa lisina desoxicolato-XLD-, agar entérico Hektoen, agar *Salmonella-Shigella*, agar Rambach y/o agar sulfito de bismuto, entre otros; **Tabla 3**), que se incuban a 37 °C durante 24-48 h. Estos medios contienen nutrientes, agentes selectivos y uno o más sistemas de reacciones diferenciales para distinguir las colonias de interés del resto de los microorganismos (Entis, 2002), debido a las altas concentraciones de bacterias distintas de *Salmonella* spp. en las muestras ambientales. Luego de la incubación, por el color de la colonia bacteriana, de cada placa se toman 2-3 colonias sospechosas de *Salmonella* spp. para su caracterización bioquímica. En ausencia de colonias típicas o sospechosas de *Salmonella* spp., igualmente, se toman 2-3 colonias de la placa a fin de descartar este género bacteriano (Andrews *et al.*, 2023). En esta etapa se diferencian las bacterias por su actividad metabólica (Gonzalez Pedraza *et al.*, 2014).

Tabla 2. Funciones de los ingredientes de los medios de cultivo de enriquecimiento selectivo utilizados para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Ingrediente	Función
Lactosa, glucosa, manitol	Fuente de carbono
Peptona de caseína, peptona de carne, extracto de carne, peptona de harina de soja, digestión enzimática de caseína, triptosa, hidrolizado ácido de caseína	Fuente de nitrógeno
Extracto de levadura	Fuente de vitaminas
Cloruro de magnesio, cloruro de sodio	Mantenimiento del equilibrio osmótico
Fosfato dipotásico, fosfato monopotásico, fosfato sódico	Amortiguador de pH
Verde de malaquita, selenito de sodio, sales biliares, tiosulfato de sodio, bilis de buey desecada, citrato de sodio, desoxicolato de sodio	Inhibidor de microbiota acompañante y/o bacterias Gram positivas

Tabla 3. Características de las colonias bacterianas compatibles con *Salmonella* spp. en los diferentes medios de cultivos selectivos diferenciales agarizados

Medio de cultivo	Color de las colonias compatibles con <i>Salmonella</i> spp.
Agar MacConkey	Transparentes
Agar xilosa lisina desoxicolato	Transparentes con centro negro
Agar xilosa lisina tergitol	Transparentes con centro negro
Agar <i>Salmonella</i>- <i>Shigella</i>	Transparentes con centro negro
Agar verde brillante	Rosa, blanca o transparente sobre fondo rosa
Agar entérico Hektoen	Verde azulada, con o sin centro negro
Agar EF-18	Verde o verde azulada
Agar sulfito de bismuto	Gris verdosa, negra, con brillo metálico a su alrededor
Agar eosina-azul de metileno	Transparentes
Agar desoxicolato citrato	Amarillenta a tostado
Agar lisina hierro modificado	Purpura con centro negro
<i>Salmonella</i> agar según ÑÓZ	Amarilla con centro negro
Agar Rambach	Roja
Agar Miller-Mallison	Transparentes con centro negro

Entre las pruebas bioquímicas que se pueden realizar se destacan (**Tabla 4**): agar hierro dos o tres azúcares (agar Kliger, del inglés *triple sugar iron agar*, TSI, respectivamente), agar lisina hierro (del inglés *lysine iron agar*, LIA), orto-nitrofenilgalactopiranosido (O.N.P.G.), agar fenilalanina, agar urea, medio sulfuro indol movilidad (SIM), citrato de Simmons, test de rojo metilo y Voges-Proskauer.

Con la cepa aislada y compatible con *Salmonella* spp., se realiza la tipificación serológica o fenotípica (quinta etapa, pruebas de aglutinación). Esta última tiene un alto poder discriminatorio y provee información con significado epidemiológico, desde el punto de vista de la vigilancia basada en el laboratorio. La disponibilidad y el costo de antisueros de alta calidad es un problema en algunos países y regiones (Caffer *et al.*, 2014). La tipificación (**Tabla 5**) es útil para determinar la fórmula antigénica completa de aislamientos de *Salmonella* spp. (Montville y Mathews, 2008). La serotipificación basada en la determinación de los antígenos somáticos (Ag O), flagelares (Ag H) y capsular (Ag Vi), si está presente, de acuerdo con el Esquema de White-Kauffmann- Le Minor, permite determinar las serovariedades reconocidas por el Centro de Referencia e Investigación de *Salmonella* -colaborador de la Organización Mundial de la Salud, del Instituto Pasteur de París, Francia (Grimont y Well, 2007, Montville y Mathews, 2008, Caffer *et al.*, 2014).

Tabla 4. Reacciones bioquímicas de *Salmonella* spp.
(Barrow y Feltham 1993; Andrews *et al.*, 2023)

Prueba o sustrato	Resultados		Reacción en especies de <i>Salmonella</i> ¹
	Positivo	Negativo	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	Fondo violeta	Fondo amarillo	+
H₂S (hierro tres azúcares -TSI, LIA y sulfuro indol movilidad - SIM)	Ennegrecimiento	Sin ennegrecimiento	+
Agar urea	Color rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de indol (SIM)	Color rosado en superficie	Color amarillo en superficie	-
Prueba de Voges-Proskauer	Color rojo a rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de rojo metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	Crecimiento, color azul	Sin crecimiento, sin cambio de color	v ²
Agar fenilalanina	Color verde	Sin cambios de color	-
O.N.P.G. (ortonitrofenilgalactopiranosido)	Color amarillo	Sin cambios de color	-

¹+: 90 % o más positivos en 1 o 2 días; -: 90 % o más negativos en 1 o 2 días;

²v: variable (*Salmonella* spp. móviles positivo e inmóviles negativo)

Tabla 5. Ejemplos de fórmulas antigénicas de las serovariedades de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de acuerdo con el esquema de White- Kauffmann- LeMinor

Serovariedad	Antígeno somático (O)	Antígeno flagelar (H)	
		Antígeno(s) H1	Antígeno(s) H2
S. Enteritidis	1, 9, 12	[f], g, m, [p]	[1, 7]
S. Dublin	1, 9, 12 [Vi]	g, p	-
S. Gallinarum	1, 9, 12	-	-
S. Heidelberg	1, 4, 5, 12	r	1, 2
S. Typhimurium	1, 4, 5, 12	i	1, 2
S. Virchow	6, 7	r	1, 2
S. Infantis	6, 7, 14	r	1, 5

4.3. *SALMONELLA* SPP. Y SALUD PÚBLICA

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial, de origen alimentario debido a que los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión (Caffer y Terragno, 2001). El principal reservorio de *Salmonella* spp. se encuentra en los animales y los microorganismos son transmitidos al hombre, ya sea por contacto directo o a través de productos alimenticios contaminados de origen animal, tales como: huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carne roja y sus derivados; carne de aves de corral; leche cruda y productos lácteos (Caffer y Pichel, 2006). *Salmonella* spp. generalmente infectan al hombre por vía oral, una vez ingerido el microorganismo se multiplica en el intestino e invade las células del huésped (Bell y Kyriakides, 2002). La principal manifestación clínica es una gastroenteritis aguda, acompañada de cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos (Caffer y Pichel, 2006). Las bacterias del género *Salmonella* se multiplican y colonizan el intestino delgado, invadiendo posteriormente los tejidos, produciendo enterotoxinas, causando inflamación y consecuentemente diarrea. Cuando el patógeno vence el sistema de defensa de su hospedador, puede alcanzar el flujo sanguíneo y/o el sistema linfático, causando una enfermedad más severa. Los niños, adultos mayores de 60 años y aquellos individuos inmunocomprometidos o aquellos que padecen enfermedades crónicas son los más vulnerables a la salmonelosis (Bell y Kyriakides, 2002).

Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* spp. pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo, el 60-80 % de los casos son esporádicos. A veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos, restaurantes, etc. (Caffer y Terragno, 2008). Si bien *Salmonella* spp. se detecta en productos avícolas, también se describieron brotes de salmonelosis causados por el consumo de productos de la pesca, leche, ensaladas, etc. El agua es uno de los vehículos de transmisión de este patógeno como así también las personas que trabajan en el procesamiento y servicio de alimentos (Yousef y Carlstrom, 2006). Por ello, el rol de los alimentos en su diseminación debe ser considerado por la industria alimenticia en relación con el control de este microorganismo (Bell y Kyriakides, 2002). El incremento registrado a escala mundial en las últimas décadas se debe a los cambios integrales asociados a factores que extienden su ocurrencia como el aumento de la población, que determina cambios en las características demográficas y costumbres culturales, migraciones internas y comercio inapropiado de alimentos. Distintos factores han contribuido también a aumentar la frecuencia de la salmonelosis: la adaptación de los microorganismos a nuevas condiciones ambientales con la emergencia de microorganismos o reemergencia de otros, aparición de grupos vulnerables o más expuestos, aceleración de la urbanización, deficiencia en la vigilancia epidemiológica, nuevos métodos de producción de alimentos en gran escala, cambios en las dietas de los consumidores (comidas fuera del hogar, incremento en el uso de las comidas comerciales) y mayor facilidad de realizar viajes internacionales. De este modo es necesario implementar medidas de control adecuadas, conformando equipos multidisciplinarios e intersectoriales, con el fin de reglamentar acciones conjuntas de educación, control, supervisión, investigación y realización de una vigilancia integrada (Abriata *et al.*, 2016).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (del inglés, CDC) estima que *Salmonella* spp. causa alrededor de 1,35 millones de infecciones, 26.500 hospitalizaciones y 420 muertes en los Estados Unidos cada año, siendo el alimento la principal causa de ello (CDC, 2023). Por otra parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) indica que la salmonelosis es la segunda enfermedad zoonótica más común detrás de la campilobacteriosis en la Unión Europea (UE), y *Salmonella* spp. es una causa común de los brotes de enfermedades de origen alimentario. En la UE se registran cada año más de 91.000 casos de salmonelosis. La EFSA ha calculado que la carga económica global de la salmonelosis humana podría ascender a 3.000 millones de euros al año (EFSA, 2023).

En Argentina, sólo fiebre tifoidea, como enfermedad transmitida por alimentos, es de notificación obligatoria, según la ley 15465/60. Actualmente, la vigilancia de la salmonelosis en Argentina se realiza a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (S.N.V. S2.0) – Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentina (S.I.S.A.), que integran distintas fuentes y estrategias de vigilancia utilizadas hasta el 2018 (C2, SIVILA, UC) y permite la participación y vinculación de los diferentes actores involucrados en la vigilancia tanto clínico, de laboratorios y epidemiológicos (Boletín Integrado de Vigilancia, 2018). De acuerdo con la Agencia Gubernamental de Control (AGC) de la ciudad de Buenos Aires, entre las bacterias más frecuentemente encontradas en casos de intoxicaciones alimentarias en dicha ciudad, *Salmonella* spp. se encuentra en el cuarto lugar (AGC, 2011). A partir de 1972, por un brote de fiebre tifoidea (*Salmonella* ser. Typhi), se serotipificaron las cepas en forma continua (Abriata *et al.*, 2006). Caffer y Pichel (2006) evaluaron la situación epidemiológica de la salmonelosis en los brotes hospitalarios en Argentina, desde 1990 a 2005. Según este estudio durante ese período de tiempo, SE fue el serotipo más frecuente en humanos, excepto durante dos años: 1991, año en el cual fue superada por ST y en 1992 por SI. En el período 2007-2017, de acuerdo a datos obtenidos por el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella*, las serovariedades prevalentes en humanos en nuestro país, fueron ST seguida por SE (Caffer, comunicación personal).

4.4. REGLAMENTACIONES SOBRE *SALMONELLA* SPP. EN ARGENTINA

Dado que *Salmonella* spp. es una bacteria zoonótica, el Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas en humanos del Ministerio de Salud de Argentina tiene incorporada a esta bacteria dentro de las principales enfermedades zoonóticas del país (Ministerio de Salud, 2011). Este Programa tiene por objetivos vigilar, prevenir y controlar las enfermedades zoonóticas.

En Argentina, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), dependiente del Ministerio de Salud de la Nación, registra semanalmente todas las notificaciones establecidas por la Ley Nacional 15.465, Enfermedades de denuncia obligatoria (Senado y la Cámara de Diputados de la Nación Argentina, 1960). Salvo para *Salmonella* ser. Typhi y *S. ser. Paratyphi* (A, B y C), causantes de fiebre tifoidea y

paratifoidea, respectivamente, la salmonelosis no es de notificación obligatoria en humanos, a diferencia de lo que pasa en otros países. En Argentina, *S. ser. Typhi* y *S. ser. Paratyphi* están en la categoría B. La misma reúne enfermedades de Registro, que por su naturaleza requieren la individualización de los "casos" para la realización de las encuestas epidemiológicas y la adopción de medidas sanitarias.

Dentro de la lista única de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos propuesta en 2023 por la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA, 2023), que incluye diferentes enfermedades animales, infecciones e infestaciones, las aves tienen incorporada a SG y SP, bacterias que no tienen importancia para el humano. Por su parte, Argentina, según la Res. SENASA 153/2021 (SENASA, 2021), indica que las enfermedades causadas por SG, SP y *Salmonella* spp. móviles pertenecen al grupo II y III en el caso de las aves son de notificación oficial obligatoria. Para ello, debe notificarse de manera inmediata si es brote epidémico (dentro de las 24 h) como caso confirmado individual.

El programa de control de salmonelosis de las aves en Argentina, incluido en el Plan Nacional de Sanidad Avícola, tiene por objetivo controlar las salmonelosis producidas por *Salmonella* spp. inmóviles (SG y SP) y móviles (SE, ST y *S. ser. Heidelberg*) en planteles de aves reproductoras abuelos, reproductoras padres y en plantas de incubación de todo el país (SENASA, 2016a). A su vez, a partir del 2016, el SENASA, mediante Resolución 86/2016, aprobó el Programa de vigilancia y control de la contaminación por *Salmonella* spp. en granjas avícolas comerciales, como parte integrante del Plan Nacional de Sanidad Avícola, y detalla la frecuencia y método de muestreo en las granjas de pollos parrilleros y gallinas de postura para monitorear la presencia de SE, ST y *S. ser. Heidelberg* (SENASA, 2016b).

5. BIOSEGURIDAD E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO EN GRANJAS

Van Hoorebecke *et al.* (2010) identificaron que las medidas de manejo y la bioseguridad, tales como prácticas de limpieza y desinfección, son factores que protegen y minimizan la introducción y persistencia de *Salmonella* spp. dentro de las granjas. Cualquier factor que predisponga a la población de animales a la presencia de enfermedades se denomina factor de riesgo. En Argentina la resolución N° 542/10 (SENASA, 2010), hoy reemplazada por la resolución N° 1699/2019, estipula los requisitos de bioseguridad, higiene y manejo sanitario para la habilitación sanitaria de establecimientos avícolas de producción comercial tales como establecimientos de producción de huevos para consumo y demás tipos de producciones avícolas. A diferencia de la resolución promulgada en el año 2010, la nueva resolución posee algunos puntos nuevos como ser (SENASA, 2019):

- Los establecimientos deben tener sistemas de desinfección para calzados y equipamiento para el lavado de manos al ingreso y egreso de los galpones.

- Las granjas de postura deben contar con un depósito de huevos separados de la granja.
- Todo establecimiento de producción comercial de aves debe estar respaldado por un equipo de sacrificio sanitario, que elimine la totalidad de sus aves.
- El equipo de sacrificio debe garantizar la aplicación de un método indoloro, que consiga una rápida inconsciencia y muerte, que requiera una mínima inmovilización, evite la excitación, sea irreversible y minimice el estrés animal. Asimismo, debe garantizar la seguridad de los operarios, así como de otras especies animales que se encuentren en la explotación.
- Todo establecimiento de producción comercial debe disponer e indicar un lugar físico dentro o cercano a su predio, donde se procederá a realizar el enterramiento de sus aves ante la implementación de sacrificio sanitario.
- Todos los establecimientos avícolas deben disponer de manuales de buenas prácticas de manejo, higiene y bioseguridad.
- Todas las granjas (aves para carne, de huevos para consumo, y los núcleos de aves reproductoras) deben cumplir con un período de descanso sanitario obligatorio, comprendido entre la salida de las últimas aves del lote y la entrada de las primeras aves del siguiente. Durante dicho período se deben realizar las tareas de tratamiento de cama usada o guano, limpieza, desinfección, desinsectación, desratización y preparación para la entrada del nuevo lote. El tiempo mínimo exigido es inicialmente de diez (10) días.
- Los establecimientos deben dar cumplimiento a los eventuales muestreos de verificación sobre la presencia de residuos de productos veterinarios y contaminantes.
- Cuando los establecimientos de aves de huevo para consumo no registran movimientos o falta de antecedentes sanitarios registrados en el sistema del SENASA por un período de dos (2) años de otorgada la habilitación sanitaria correspondiente es causal de la cancelación de dicha habilitación.

Las medidas de protección y prevención sanitaria que la granja debe adoptar para una producción segura se enmarcan dentro de las medidas de bioseguridad que sean adoptadas. La palabra “bioseguridad”, para los productores avícolas, puede significar la diferencia entre la salud y la enfermedad de sus lotes. Si el lote se encuentra sano, aumenta la producción y con ello, el beneficio (USDA, 2006). Un buen plan de bioseguridad es como una cadena en la que todos los eslabones deben estar en buenas condiciones. Si tan solo un eslabón está roto, la cadena no va a funcionar. Igualmente, si las medidas de bioseguridad sólo son implementadas en ciertas áreas de la granja avícola y no implementadas en otras no serán efectivas. Un plan de bioseguridad efectivo debe tener las siguientes características (Gernat, 2004):

- a) Definir los objetivos y las responsabilidades.
- b) Asignar responsabilidades a individuos
- c) Proveer supervisión a los individuos asignados con esas responsabilidades.
- d) Aislar la granja para prevenir la entrada o salida de una enfermedad infecciosa.
- e) Puede ser ajustado a medida que las condiciones locales y amenazas de enfermedades cambian regionalmente.

Entre las medidas de bioseguridad que deberían adoptarse se mencionan (USDA, 2006):

1. Mantener distancia: para mantener el lote en el mejor estado sanitario, se necesita aislarlo de los visitantes y de otras aves; esto se logra al:

- a. Restringir el acceso a la propiedad.
- b. Cercar el área donde se encuentran las aves, esto forma una barrera entre áreas “limpias” y “sucias”. El área limpia será la zona alrededor de las aves.
- c. Disponer de botas limpias para los visitantes.
- d. Tener un programa de control de roedores.

2. Mantener la limpieza dentro del galpón:

- a. Disponer un calzado y ropa para usar únicamente dentro del galpón.
- b. Lavarse las manos con agua y jabón, y desinfectante antes de ingresar a trabajar con el lote.
- c. Limpiar jaulas y comederos.
- d. Limpiar y desinfectar los equipos que están en contacto con las aves y las heces.
- e. Antes de desinfectar, eliminar todas las heces, basura, y plumas; luego limpiar las superficies con agua y jabón.

3. Evitar transportar la enfermedad a la granja:

- a. Si se traslada a otro lugar de producción, asegurarse de limpiar el transporte antes del regreso a la granja.
- b. No mezclar nuevas aves en un lote ya instalado; no mezclar aves viejas con jóvenes.
- c. No compartir materiales con granjas vecinas (equipamiento, jaulas etc.). En caso de hacerlo, desinfectarlos antes del ingreso a la granja.
- d. Nunca compartir pallets de madera o maples con otras granjas; estos materiales son porosos y, por lo tanto, difíciles de desinfectar.

La bioseguridad debe ser vista como una de las áreas más importantes para un buen manejo de la producción. La aplicación de un amplio rango de procedimientos enfocados a prevenir o limitar la exposición del lote a los diversos efectos de los organismos patógenos conforma el fundamento del éxito económico en la producción. Los procedimientos a aplicar requieren de un plan detallado y deben delinearse dentro de un plan veterinario práctico y responsable. Las aplicaciones de estos procedimientos pueden resultar en un costo-beneficio para alcanzar el objetivo de disminuir el impacto de las enfermedades tanto de importancia veterinaria como en salud humana (Lister, 2008).

6. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son moléculas antimicrobianas naturales o sintéticas que se utilizan contra diversas enfermedades causadas por infecciones bacterianas, pero no son eficaces contra infecciones fúngicas o virales. Actúan bloqueando selectivamente algunos procesos cruciales en las células microbianas (Upmanyu y Malviya, 2020). Existen varias formas de clasificar los antibióticos pero los esquemas de clasificación más comunes se basan en sus estructuras moleculares, modo de acción y espectro de actividad. Los antibióticos dentro de la misma clase estructural generalmente mostrarán un patrón

similar de efectividad, toxicidad y posibles efectos secundarios alérgicos (Etebu y Ariekpar, 2016).

6.1. CLASIFICACIÓN

Según su efecto *in vitro* sobre las bacterias: bactericidas y bacteriostáticos. La enseñanza común a menudo explica que los antibióticos bactericidas "matan" las bacterias y los antibióticos bacteriostáticos "impiden el crecimiento" de las bacterias. La verdadera definición no es tan simple. Para definir con precisión cada categoría, se debe comprender la concentración inhibidora mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). La concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano visible a las 24 h es la CIM. El CBM es la concentración de un antibiótico que reduce la densidad bacteriana 1.000 veces en 24 h. La actividad bacteriostática se define además por una proporción de CBM a CIM superior a 4, mientras que una proporción de CBM a CIM inferior o igual a 4 es bactericida (Patel *et al.*, 2023). Algunos antibióticos bacteriostáticos pueden exhibir actividad bactericida contra determinadas bacterias (Nemeth *et al.*, 2015). Por lo tanto, los antibióticos bacteriostáticos también matan bacterias, pero la definición de laboratorio hace que parezca que no lo hacen. Este concepto funciona a la inversa y los antimicrobianos bactericidas también pueden ser bacteriostáticos contra determinadas cepas y afecciones bacterianas. A su vez, según su mecanismo molecular de acción contra las células bacterianas, los antibióticos se dividen principalmente en cinco clases principales, que se detallan abajo.

6.1.1. β -lactámicos

Los glicopéptidos y los β -lactámicos son tipos específicos de antibióticos que interfieren con pasos críticos en la homeostasis de la biosíntesis de la pared celular. Contienen un anillo de 3 carbonos y 1 nitrógeno, que es muy reactivo. La síntesis de la pared celular bacteriana se inhibe porque estos antibióticos inhiben la función proteica esencial requerida para esta función y, por lo tanto, matan o inhiben el crecimiento de las bacterias. Los miembros importantes de la familia de los β -lactámicos incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Upmanyu y Malviya, 2020).

6.1.1.1. Penicilinas

La penicilina fue descubierta e informada por primera vez en 1929 por Alexander Fleming, se encontraba entre varios otros compuestos antibióticos llamados penicilinas. (McGeer *et al.*, 2001). Las penicilinas están involucradas en una clase de grupo diverso de compuestos, la mayoría de los cuales terminan en el sufijo -cillin. Son compuestos de betalactámicos que contienen un núcleo con un anillo de ácido 6-animopenicilánico (lactama más tiazolidina) y otras cadenas laterales del anillo (Zahner y Maas, 1972). Los miembros de la clase de penicilina incluyen penicilina G, penicilina V, oxacilina

(dicloxacilina), meticilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, piperacilina, mezlocilina y ticarcilina (Boundless, 2016).

6.1.1.2. Cefalosporina

Los miembros de este grupo de antibióticos son similares a la penicilina en su estructura y modo de acción. Forman parte de los antibióticos más prescritos y administrados. El primer miembro conocido de este grupo de antibióticos fue aislado por primera vez por Guiseppe Brotzu en 1945 del hongo *Cephalosporium acremonium*. Aunque el fármaco fue aislado por primera vez por Guiseppe Brotzu, fue Edward Abraham quien obtuvo el mérito de patentarlo al haber podido extraer el compuesto. Las cefalosporinas contienen 7 núcleos de ácido aminocefalosporánico y una cadena lateral que contiene anillos de 3,6-dihidro-2H-1,3-tiazano (Talaro y Chess, 2008; Pegler y Healy, 2007). Se subdividen en generaciones (1ª a 5ª) según el organismo objetivo, pero las versiones posteriores son cada vez más eficaces contra los patógenos gramnegativos. Las cefalosporinas tienen una variedad de cadenas laterales que les permiten unirse a diferentes proteínas de unión a penicilina, sortear la barrera hematoencefálica, resistir la degradación por cepas bacterianas productoras de penicilinasa e ionizarse para facilitar la entrada a las células bacterianas gramnegativas (Abraham, 1987).

6.1.1.3. Monobactámicos

El descubrimiento de esta clase de antibióticos fue informado por primera vez por Skyes y sus colaboradores. El antibiótico se obtuvo de la bacteria *Chromobacterium violaceum*. Son parte de compuestos betalactámicos pero, a diferencia de la mayoría de los otros betalactámicos, el anillo betalactámico de los monobactámicos es independiente y no está fusionado a otro anillo (Bonner y Sykes, 1984; Sykes y Bonner, 1985). Aztreonam es el único antibiótico monobactámico disponible comercialmente, con un espectro de actividad estrecho.

6.1.1.4. Carbapenémicos

Según se informa, la tienamicina se considera el primer “carbapenem” y sirve como estándar para todos los demás carbapenems (Papp-Wallace *et al.*, 2011). También se han identificado muchos otros carbapenémicos (Cassidy *et al.*, 1981; Kobayashi *et al.*, 1982). Los carbapenémicos ocupan un lugar muy importante en la lucha contra las infecciones bacterianas, esto se debe a que son capaces de resistir la acción hidrolítica de la enzima beta-lactamasa. Entre los varios cientos de betalactámicos conocidos, los carbapenémicos poseen el espectro de actividad más amplio y la mayor potencia contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Como resultado, a menudo se les llama “antibióticos de último recurso” y se administran cuando los pacientes con infecciones enferman gravemente o se sospecha que albergan bacterias resistentes (Torres *et al.*, 2007). Ejemplos de carbapenem son: Imipenem, Meropenem y Ertapenem.

Lamentablemente, se ha informado de la aparición de patógenos bacterianos resistentes a esta clase de antibióticos que salvan vidas. Más preocupante es el hecho de que la resistencia bacteriana a los carbapenémicos está aumentando a nivel mundial (Livermore *et al.*, 2011; Patel y Bonomo, 2011).

6.1.2. Macrólidos

Los macrólidos pertenecen a la clase de antibióticos naturales y tienen un gran anillo de lactona macrocíclica. En 1952, el primer macrólido descubierto fue la eritromicina, y más tarde se desarrollaron otros macrólidos, incluidas la azitromicina y la claritromicina, modificando químicamente la eritromicina. La acción de los macrólidos se considera bacteriostática, aunque su efecto a largo plazo es letal para los patógenos. Ejercen su efecto interactuando con el sitio P en la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano. De esta manera, evitan que la peptidiltransferasa agregue nuevos péptidos durante la traducción y, por lo tanto, inhibe el proceso de elongación de la proteína. También se observó un efecto similar con el anfenicol (cloranfenicol). Las lincosamidas (clindamicina) y las estreptograminas (dalfopristina, quinupristina) también tienen un efecto bacteriostático sobre los patógenos y su mecanismo de acción es similar al de los macrólidos. Sin embargo, ambos son incapaces de difundirse a través de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Por lo tanto, son eficaces únicamente contra bacterias Gram positivas. A diferencia de los macrólidos, la lincosamida y el cloranfenicol, que inhiben el alargamiento de las proteínas durante la traducción, las oxazolidinonas (linezolid) bloquean el paso de iniciación de las proteínas. Sin embargo, también se unen a la subunidad 50 S del ribosoma, pero en un sitio de unión diferente, e inhiben la unión de N-formilmetionil-ARNt al ribosoma. De esta forma evitan la formación de un complejo de iniciación durante la traducción (Upmanyu y Malviya, 2020).

6.1.3. Aminoglucósidos y Tetraciclina

Los antibióticos que inhiben el ribosoma 30 S incluyen las familias de antibióticos aminoglucósidos- aminociclitol y tetraciclina. Las tetraciclinas bloquean la disponibilidad de aminoacil-ARNt para el ribosoma. La clase de antibióticos aminociclitol (espectinomina) y la familia de antibióticos aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina, tobramicina, frameticina, gentamicina) se unen a la subunidad del ribosoma 30 S en su componente de ARNr 16 S. La espectinomina actúa sobre la estabilidad del peptidil-ARNt. La espectinomina se une a la subunidad del ribosoma 30 S e inhibe la translocación catalizada por el factor de elongación sin causar una traducción errónea de proteínas (Ian y Marilyn, 2001). Por otro lado, los aminoglucósidos y la interacción 16 S rRNA causan cambios conformacionales en el complejo formado entre el codón de mRNA y su aminoacilRNA cargado en el ribosoma, causando además un desajuste de tRNA que luego resulta en una mala traducción de proteínas (Davis *et al.*, 1986; Epe, 1984; Leach *et al.*, 2007). Los antibióticos aminoglucósidos son bactericidas.

6.1.4. Quinolonas

Los antibióticos quinolónicos interfieren con el mantenimiento de la topología cromosómica al atacar la ADN girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV (topo IV). Atrapan estas enzimas en la etapa de escisión del ADN e impiden que las cadenas se vuelvan a unir. Aunque existen similitudes funcionales entre topo IV y girasa, varias especies bacterianas muestran diferencias en la susceptibilidad a los antibióticos quinolonas. Esta clase de antibióticos es un derivado del ácido nalidíxico, que se descubrió como un subproducto de la síntesis de cloroquina (quinina). El ácido nalidíxico se introdujo como compuesto antimicrobiano en la década de 1960 para tratar las infecciones del tracto urinario. Esta y otras quinolonas de primera generación (ácido oxolínico) rara vez se utilizan hoy en día debido a su efecto tóxico para las células humanas. Las quinolonas de segunda (ciprofloxacina), tercera (levofloxacina) y cuarta (gemifloxacina) se pueden clasificar según su estructura química junto con las diferencias cualitativas en cómo estos fármacos matan las bacterias (Upmanyu y Malviya, 2020).

6.1.5. Sulfonamidas

El ácido fólico es un compuesto importante para la síntesis de bases nitrogenadas, es decir, purina y pirimidina y por tanto la síntesis de ácido nucleico. Las sulfonamidas no sólo bloquean la formación de ácido fólico sino que su incorporación a los precursores provoca la formación de un pseudometabolito que es reactivo y antibacteriano. La ventaja de usar este medicamento es que las células de los mamíferos no tienen efectos secundarios de la sulfonamida porque absorben y usan ácido fólico preformado. La combinación de sulfonamidas y trimetoprima u otras diaminopirimidinas aumenta la potencia de estos antibióticos (Choquet-Kastylevsky *et al.*, 2002). Además del efecto bacteriostático, también poseen propiedades antifúngicas y antipalúdicas (Laurence *et al.*, 2006). Las trimetoprimas son otro tipo de antibiótico que también inhibe la síntesis de la ácido reductasa dihidrofólica bacteriana y, por tanto, actúa sobre la misma vía metabólica que las sulfonamidas. Cuando se usan en combinación con sulfonamidas, estos fármacos tienen actividad sinérgica (Upmanyu y Malviya, 2020).

6.2. USO DE ANTIBIÓTICOS EN GRANJAS DE CRÍA INTENSIVA

Los antibióticos son usados en medicina humana y veterinaria para el tratamiento y prevención de enfermedades. También pueden ser utilizados como agentes promotores del crecimiento en concentraciones sub-terapéuticas en la alimentación. Bacitracina, clortetraciclina, tilosina, neomicina, oxitetraciclina, virginiamicina y otros se utilizan para estos fines (Phillips *et al.*, 2004; Apata, 2009, Van Bunnik y Woolhouse, 2017). La OMSA (OIE, 2018), en su informe anual sobre los agentes antimicrobianos destinados a ser utilizados en los animales, informó los resultados obtenidos de 155 países (153 miembros de la OMSA y 2 no miembros). Del total de países, sólo 45 (n=155, 29 %) usaban antimicrobianos como promotores de crecimiento y de éstos sólo 30 países (n=45; 67 %) informaron una lista de agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento. Los agentes antimicrobianos más enumerados a estos efectos fueron

bacitracina y tilosina, que, de acuerdo con la “Lista de la OIE de agentes antimicrobianos de importancia veterinaria”, se clasifican como agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada y agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica, respectivamente. La colistina fue mencionada por 12 países (**Figura 1**).

Dentro de los antimicrobianos se incluyen a los desinfectantes, antisépticos y a los quimioterápicos (antibióticos). Las clases de antibióticos usados como terapéuticos en avicultura incluyen aminoglucósidos, tetraciclinas, β -lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, polipéptidos, sulfonamidas y trimetoprima (Stolker y Brinkman, 2005). En medicina veterinaria existen casos documentados de bacterias del género *Salmonella* spp., y de otras enterobacterias como *Escherichia coli* que pueden afectar al hombre. Un importante elemento de riesgo es el enorme potencial de intercambio genético que existe en el intestino. Esta es una de las causas que explica que sean estos dos géneros Gram negativos, los que representen los mayores riesgos de transferencia zoonótica de resistencia (Errecalde, 2004).

Alcaine *et al.*, (2007) informaron que de las 10 serovariedades de *Salmonella* spp. comúnmente reportadas por el CDC, aisladas de infecciones humanas en los Estados Unidos, al menos 8 aislamientos mostraron resistencia a 5 o más antimicrobianos. Estos autores observaron que ST presentó 1 o 2 patrones de multirresistencia, incluyendo resistencia a antimicrobianos de los grupos de β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos e inhibidores de la vía del folato. Para *S. ser. Heidelberg* se observó multirresistencia a antimicrobianos de los grupos de β -lactámicos, β -lactámicos + inhibidores de β -lactamasas y cefalosporinas. Aunque SG es un huésped adaptado a especies de aves y presenta un riesgo zoonótico mínimo (Shivaprasad, 2000), el incremento de la resistencia a los antimicrobianos en esta bacteria se ha convertido en un problema (Kang *et al.*, 2010). Lee *et al.*, (2003) reportaron que SG en 1995 era susceptible a la mayoría de los antibióticos convencionales. Sin embargo, cepas aisladas en el año 2001 fueron resistentes a varios de ellos. Por otro lado, Kang *et al.*, (2010) informaron que 105 aislamientos de SG, obtenidos de pollos entre 2002 y 2007, demostraron 30 patrones de resistencia antimicrobiana diferentes. De estos 105 aislamientos, 103 (98,1 %) eran resistentes al ácido nalidíxico y 99 (94,3 %) eran resistentes o resistentes de forma intermedia a la enrofloxacin y ciprofloxacina.

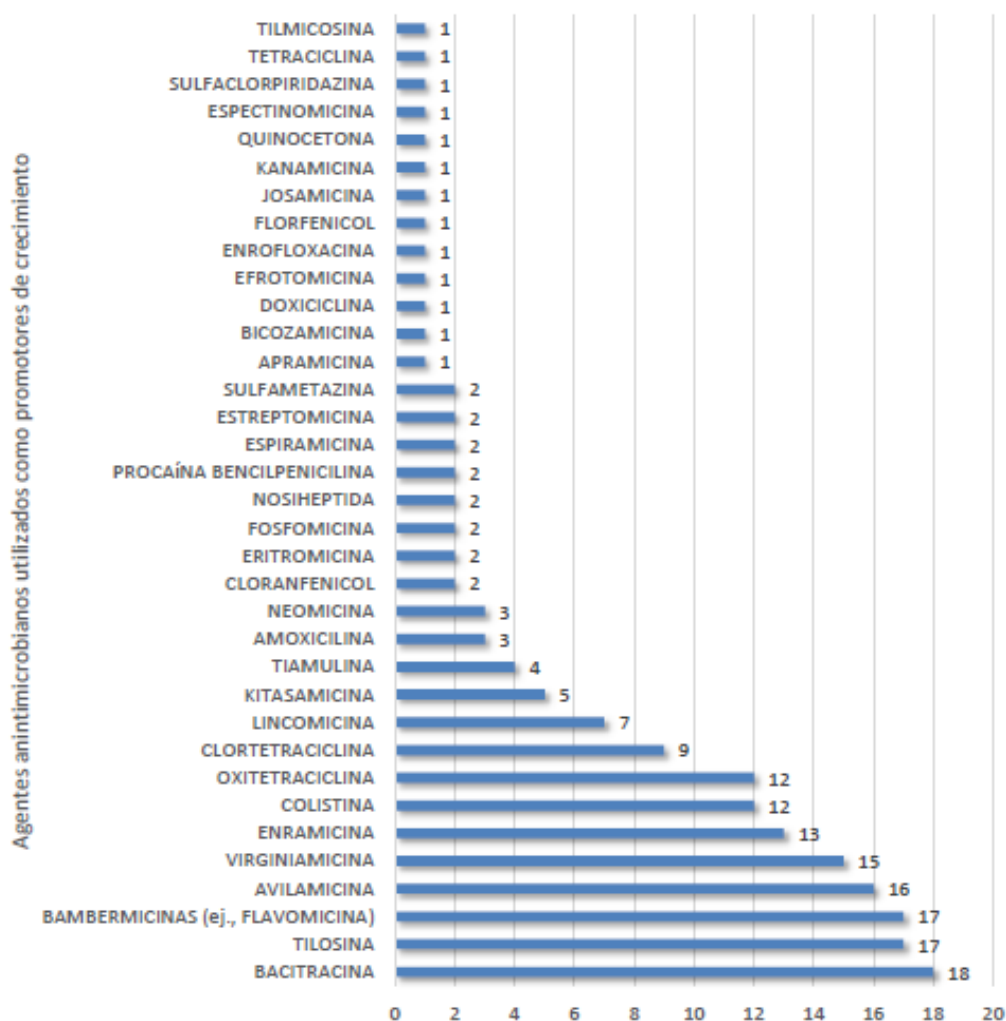


Figura 1. Agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento en animales durante el año 2017 (OMSA, 2018)

Por lo antes expuesto, el comité internacional de la OMSA (2019) unificó los criterios para la clasificación de los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria dividiéndolos en agentes antimicrobianos de importancia crítica, agentes de importancia elevada y agentes de importancia. Dentro de la categoría de agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica, algunas clases son de importancia crítica tanto para la salud humana como para la sanidad animal, como es actualmente el caso de las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación. En 2016, la colistina se agregó a la categoría de agentes antimicrobianos de importancia crítica y de prioridad máxima de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Por lo tanto, el uso racional de los antimicrobianos debe basarse en el conocimiento de las estructuras y las vías bioquímicas dentro de las bacterias y de las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los mismos. Esto implica considerar la manera en que los medicamentos actúan para inhibir el crecimiento o matar a los microorganismos y el grado en que los medicamentos son capaces de penetrar en los sitios de infección *in vivo* (AliAbadi y Lees, 2000).

6.3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Una ruta eficiente en la adquisición de resistencia a los antimicrobianos es a través de elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos, transposones e integrones (Cabrera et al., 2006). Las cepas multirresistentes resultantes por la adquisición de estos elementos genéticos han sido encontradas en todo el mundo y son una gran preocupación en la salud pública y la inocuidad de los alimentos (Alcaine *et al.*, 2007). La resistencia a los antibióticos es la capacidad que tienen los microorganismos de resistir al efecto de dichos fármacos, es decir que los microorganismos no mueren, y su crecimiento no se detiene. Las bacterias encuentran inevitablemente maneras de resistir a los antibióticos creados para destruirlos, haciéndolos ineficaces; por lo que es necesario evitar el desarrollo de una nueva forma de resistencia a través de cambios genéticos e impedir que la resistencia que ya existe se propague (Dominguez, 2016). La detección y monitoreo de la multirresistencia es importante para modificar la selección de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas como la salmonelosis y para evaluar el riesgo de expansión de cepas multirresistentes (Yang *et al.*, 2002; Grazziani *et al.*, 2007). Por lo tanto, determinar el impacto de estas bacterias resistentes es un desafío permanente, ya que muchas clases de antimicrobianos utilizados en animales destinados a alimentos son análogos a los usados en la terapéutica humana y por lo tanto eso llevaría a seleccionar fenotipos de resistencia similares (CDC, 2012). El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos puede ser (Alanis, 2005):

- ✓ **Intrínseca (espontánea)**, basada en las mutaciones de genes codificados sobre el cromosoma bacteriano, que ocurre de forma espontánea en ausencia de presión de selección antimicrobiana.
- ✓ **Adquirida**, cuando un nuevo material genético es intercambiado entre los organismos. Esto se produce cuando al menos una bacteria dentro de un grupo heterogéneo lleva el determinante capaz de expresar la resistencia al antibiótico.

Ambos tipos de resistencia espontánea o adquirida se puede transmitir horizontalmente o verticalmente. La transmisión horizontal de la resistencia puede ocurrir a través de varios mecanismos, es decir el material genético puede ser transferido entre los microorganismos a través de tres rutas principales:

- **transformación**: algunas bacterias son capaces de captar ADN libre desde el ambiente e incorporarlo a su cromosoma;
- **transducción**: donde virus que infectan bacterias (bacteriófagos) median la transferencia de ADN entre bacterias vía la transducción, en el cual ADN de una bacteria donante es empaquetado en la partícula del virus y es transferido a una bacteria receptora, durante la infección;
- **conjugación**: es el mecanismo de transferencia de genes responsable de los aspectos más preocupantes de la resistencia antimicrobiana. Se forma un pilus sexual (pequeño tubo) entre dos células bacterianas a través del cual se transfiere ADN plasmídico.

Estas mutaciones o genes de resistencia pueden acumularse en ciertas especies bacterianas patógenas que conducen a fenotipos complejos cada vez más reconocidos en todo el mundo (Pournaras *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011). En general, se denominan bacterias resistentes a múltiples fármacos y, debido a esta particularidad, pueden sobrevivir bajo la acción de diferentes compuestos antimicrobianos, lo que aumenta la oportunidad de propagación (Cantón *et al.*, 2003). Se han utilizado diferentes definiciones para bacterias resistentes a múltiples fármacos. Una iniciativa conjunta del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, (ECDC) y el CDC redefinió recientemente. Estas definiciones se establecen a nivel fenotípico, pero no consideran los aspectos genéticos de los mecanismos de resistencia involucrados (Magiorakos *et al.*, 2012).

- **resistente a múltiples fármacos** (MDR, por sus siglas en inglés *Multi-Drug Resistance*): es la resistencia al menos a un agente perteneciente a tres o más categorías antimicrobianas.
- **ampliamente resistente a los medicamentos** (XDR, por sus siglas en inglés *Extensively-Drug -Resistance*): es la resistencia al menos a un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto a uno o dos de ellos (es decir, los aislamientos bacterianos siguen siendo susceptibles a solo una o dos categorías).
- **pandrogá resistente** (PDR, por sus siglas en inglés *Pan Drug -Resistance*): es la resistencia a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos.

Otros términos también se han utilizado en la literatura científica para referirse a fenotipos resistentes a múltiples fármacos. Estos incluyen (Canton y Ruiz-Garbajosa, 2011):

- **"co-resistencia"**: implica la transferencia de varios elementos genéticos al mismo aislamiento bacteriano y/o la adquisición de mutaciones en diferentes *loci* genéticos que afectan a diferentes fármacos antibacterianos.
- **"resistencia cruzada"**: se produce por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia que afectan a agentes antimicrobianos de la misma clase.
- **"resistencia pleiotrópica"**: afecta a varias clases de antimicrobianos debido al mismo evento genético, como la mutación o la adquisición de un gen de resistencia.

Ante la importancia del uso responsable de antibióticos en animales, el SENASA creó el Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en animales destinados al consumo humano en el 2015 con el objetivo de prevenir la generación y difusión de bacterias que resisten la acción de los antibióticos. El programa busca determinar y monitorear la resistencia a diferentes antimicrobianos en bacterias comensales y zoonóticas como *Salmonella* spp. para evaluar posibles medidas que puedan retrasar o impedir la emergencia y diseminación de bacterias resistentes y, así, minimizar su riesgo en la salud pública y animal. (SENASA, 2015). Este trabajo acompaña a otros que vienen realizando profesionales del INTA y de diferentes Universidades en el monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos por parte de *Salmonella* spp. aisladas desde aves y ambientes avícolas.

Por otro lado, a fin de establecer los mecanismos necesarios para promover la prevención y el control de la resistencia a los antimicrobianos en Argentina, se declaró de interés público nacional la prevención y el control de la resistencia a los antimicrobianos en 2022 a través de la Ley 27.680. Esto convirtió a Argentina en el primer país de la región panamericana en obtener una ley destinada a promover el uso responsable de antibióticos y regular cuestiones referidas al expendio y uso de estos medicamentos, es decir venta bajo receta archivada, bajo el paradigma de “Una Salud”, un concepto que abarca la salud humana, animal y ambiental (OPS, 2022).

7. ACEITES ESENCIALES COMO ALTERNATIVA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia bacteriana es un grave problema asociado a múltiples causas, muchas de ellas inevitables, cuyo control requiere una actuación multidisciplinar. El riesgo más grande para la salud humana derivado de la utilización de los antibióticos en sanidad animal es la transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre o de genes portadores de resistencia entre las bacterias animales y humanas (FAO, 2004). Esta inquietud por la seguridad alimentaria de la “*granja a la mesa*” ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas entre productos de origen natural (Manzanilla *et al.*, 2004; Dubois-Brissonnet *et al.*, 2011; Martínez, 2014; Mith *et al.*, 2014).

Los aceites esenciales (AE) son sustancias olorosas producidas en el metabolismo secundario de las plantas aromáticas y almacenadas en distintos órganos de la planta, que se obtienen mediante destilación o expresión del material vegetal (Mith *et al.*, 2014; Villada, 2018). En su composición pueden intervenir varios compuestos de aromas volátiles, como hidrocarburos (terpenos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles, variando en función del grado de madurez de la planta, su origen geográfico (temperatura, característica del terreno, fertilizantes, etc.), el método de extracción (Oladimeji *et al.*, 2001; Lahlou y Berrada, 2003; Martínez, 2014).

Si bien los compuestos mayoritarios de los AE pueden constituir hasta un 85 % del total, debido al efecto sinérgico de los componentes presentes en trazas, el aceite esencial en su totalidad tiene mayor actividad que sus principales principios activos (Bauer *et al.*, 2001; Burt, 2004). De igual modo, debido a su complejidad química es muy probable que el efecto antimicrobiano sea debido a la acción combinada de varios mecanismos sobre distintas localizaciones de la célula (Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; Rota *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2015).

Las propiedades medicinales de los AE han sido destacadas y utilizadas de forma empírica por el hombre desde la antigüedad, si bien, es en las últimas décadas cuando se han incrementado las investigaciones sobre sus propiedades farmacológicas y antimicrobianas (Rota *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2005; Martínez 2014). Los trabajos desarrollados han demostrado, en general, una notable sensibilidad a los AE, así como una reducción considerable de las dosis de algunos antibióticos si se usan combinados con AE (Palaniappan y Holley, 2010; Becerril *et al.*, 2012; Yap *et al.*, 2014). Sin embargo, y a diferencia de los antibióticos, la mayoría de los AE son considerados productos GRAS (generalmente reconocidos como agentes seguros) por la FDA y ello les hace buenos candidatos para su uso como aditivos (Díaz-Sánchez *et al.*, 2015). Actualmente, los AE

están autorizados para su utilización en alimentación humana y animal como aditivos alimentarios. Como consecuencia de ello, no existe un protocolo estandarizado ni puntos de corte establecidos para determinar su actividad *in vivo* y el carácter sensible o resistente de los microorganismos (Silva *et al.*, 2013).

Los AE pueden extraerse directamente de la materia prima vegetal mediante el uso de diferentes métodos, entre los cuales se encuentran el prensado, enfleurage, maceración, extracción con solventes volátiles, y la destilación por arrastre mediante vapor de agua que es uno de los métodos más utilizado y consiste en colocar la materia prima vegetal o carga (fresca y previamente cortada) en una cámara inerte. Una vez que la carga se encuentre dentro de la cámara, se somete a una corriente de vapor de agua sobrecalentada. El calor que desprende el vapor rompe las cámaras de almacenamiento de la esencia en la carga y la fase gaseosa arrastra dicha esencia (debido a la volatilidad) hacia la parte superior del recipiente. Dicho vapor se extrae por la parte superior del recipiente (destilador) y se condensa mediante intercambio térmico. Se recolecta el condensado, que luego es sometido a una separación por densidad entre la esencia y el hidrolato, ya que los AE son menos densos que el agua y flotará sobre la misma. Por último la extracción con fluidos supercríticos que es un método de desarrollo reciente en la cual la materia prima se corta en trozos pequeños o es molida, y luego de preparar la carga, ésta se empaca en una cámara de acero inoxidable donde se hace circular un líquido en estado supercrítico (por ejemplo, CO₂). Las esencias son solubilizadas y arrastradas por el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor, eliminándolo luego de la cámara mediante descompresiones sucesivas hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. El CO₂ cambia a fase gaseosa y se extrae del recipiente quedando sólo el aceite esencial (Noguera, 2020).

7.1. Aceite esencial de orégano

El nombre común del orégano es utilizado en varias especies: *Origanum* (familia: Lamiaceae) y *Lippia* (familia: Verbenaceae), entre otras. Los principales compuestos antimicrobianos identificados en los diferentes aceites esenciales de orégano son el carvacrol y el timol. Sin embargo, su contenido puede variar según la especie, temporada de cosecha y origen geográfico (Rodríguez-García *et al.*, 2016; Shange *et al.*, 2019). El timol y el carvacrol son los componentes antimicrobianos de mayor importancia presentes en AE de orégano. Estos compuestos desintegran la membrana externa de las bacterias Gram negativas, liberando parte del lipopolisacárido y, por lo tanto, aumenta la permeabilidad del ATP (trifosfato de adenosina) en la membrana citoplasmática produciendo poros en ésta, y lizando a la bacteria (Abdul Qadir *et al.*, 2017; Zairi *et al.*, 2019).

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los AE de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *ST*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y

las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Elgayyar *et al.*, 2001, Aligiannis *et al.*, 2001).

Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula sp.*; pero no contra *Pseudomonas aeruginosa* (Sivropoulou *et al.*, 1996). Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del AE. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Sivropoulou *et al.*, 1996, Elgayyar *et al.*, 2001). Otros compuestos, como -cimeno y -terpineno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas (Aligiannis *et al.*, 2001, Sivropoulou *et al.*, 1996). Los valores de la CMI para los AE se han establecido entre 0,28-1,27 mg/ml para bacterias, y de 0,65-1,27 mg/ml para hongos (Aligiannis *et al.*, 2001).

7.2. Aceite esencial de romero

El romero (*R. officinalis*) es una planta de hojas fragantes, perennes y de color verde (Basheer, 2018), con flores azul blanquecinas (Ali *et al.*, 2019), nativa del Mediterráneo, del norte y sur de África, así como de Asia Occidental (Karadağ *et al.*, 2019). Crece en muchos lugares del planeta (en suelos secos o moderadamente húmedos), alcanzando una altura de 1 a 2 metros. No tolera suelos anaeróbicos o muy mojados, pero sí los de salinidad media (Borges *et al.*, 2018). Florece en primavera, soporta bien las podas, se multiplica por gajos o semillas, y se desarrolla bien tanto en el suelo como en maceta (Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria, 2024).

El romero posee alrededor de un 0,5-2,5 % de AE con propiedades antimicrobianas (Basheer, 2018), conformado en su mayor parte por 1,8-cineol (15-50 %), alcanfor (15-25 %), α -pineno (10-25 %), canfeno (5,2-8,6 %) y borneol (3,2-7,7 %) (Sumintarti *et al.*, 2018). El AE de mayor calidad es obtenido de sus hojas, donde se encuentra la mayoría de las tricomas glandulares que lo secretan (Elyemni *et al.*, 2019). La actividad antimicrobiana de los extractos y AE del romero es atribuida principalmente al α -pineno, el acetato de bornilo, el alcanfor y el 1,8-cineol (Ebrahimi *et al.*, 2020). El ácido rosmárico es uno de los componentes fenólicos más comunes en las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae (Sik *et al.*, 2020), cuyas propiedades y actividad biológica se deben especialmente a la presencia de este metabolito (Sik *et al.*, 2019). Se ha reportado que en los extractos de romero alrededor del 24 % de las moléculas volátiles que contiene pertenecen a los terpenos (como la verbenona), acetato de bornilo, alcanfor y α/β cariofileno (Sadeh *et al.*, 2019), se ha identificado una composición mayor de α -pineno, borneol y 1,8-cineol (Karadağ *et al.*, 2019). Contiene rosmanol, isorosmanol, rosmadial y metil carnosato, moléculas con propiedad antioxidante (Quintana *et al.*, 2019). También se ha aislado la salvigenina y la cirsimaritina (Karim *et al.*, 2017), así como alcoholes triterpénicos, ácido oleanólico, rosmaquinonas (Beltrán *et al.*, 2017). Otros metabolitos de importancia encontrados son también el ácido ursólico y betulínico (Benelli

y Oliveira, 2019). El aceite esencial del romero emite un intenso aroma a alcanfor, debido al elevado contenido de esta molécula, con un peso de 14,5 % (Bilska *et al.*, 2019).

7.3. Aceite esencial de espartillo

Las especies del género *Elionurus* comprende 15 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales de África, Australia y América (Sara Moreno *et al.*, 2018). En América habitan 7 taxones y para la Argentina se mencionan 2 especies *E. muticus* (Spreng.) Kuntze y *E. tripsacoides* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Denham, 2012). *Elionurus muticus* es la especie del género más ampliamente distribuida, habita desde Brasil hasta la Argentina, como así también en África. En Argentina, es posible encontrarla en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, La Pampa, Misiones, Salta, Santa Fe y Santiago del Estero. Allí se la conoce con nombres comunes tales como "pasto amargo", "pasto bravo", "espartillo", "espartillo guazú".

Elionurus muticus constituye un valioso recurso renovable. Con un manejo apropiado, puede emplearse como especie forrajera para alimentar el ganado (Castro y Ramos, 2003; Hess *et al.*, 2007). Además, se han reportado diferentes usos de esta especie en medicina popular debido a sus propiedades sudoríficas, febrífugas, afrodisíacas y antioxidantes (Dzingirai *et al.*, 2007; Muchuweti *et al.*, 2007). Las partes aéreas brindan un aceite esencial aromático que posee acción analgésica y antibacterial (Sara Moreno *et al.*, 2018). Presenta también actividad antifúngica, citotóxica e insecticida, por lo que se sugirió que podría emplearse en la agroindustria (Stuckert, 1904; Vidal, 1954; Cacciabue *et al.*, 2005; Sabini *et al.*, 2006; Dzingirai *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2014; Colpo *et al.*, 2014). Otra característica interesante de *E. muticus* es que más del 80 % de la resina de sus aceites aromáticos está compuesta por citral (Scramin *et al.*, 2000; Füller *et al.*, 2014). Este compuesto posee un fuerte aroma cítrico motivo por el cual fue propuesto como un sucedáneo de la citronela (Kolb *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2014), de gran valor en las industrias aromáticas, de alimentos, cosmética y farmacéutica (Heydorn *et al.*, 2003; Koshima *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007; Colpo *et al.*, 2014). Asimismo, la composición química de los AE es muy variable en *E. muticus* (Chagonda *et al.*, 2000), habiéndose observado diferencias en sus principales componentes en relación a los cambios estacionales (Hess *et al.*, 2007) y a la procedencia geográfica de las plantas (Füller *et al.*, 2010, 2014). La presencia del citral ha sido detectada en plantas provenientes del centro-oeste de Brasil, aunque sería más abundante en algunas poblaciones del sur de Brasil y en particular, en el nordeste argentino (Scramin *et al.*, 2000; Cacciabue *et al.*, 2005; Sabini *et al.*, 2006; Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de poseer un gran potencial para su explotación comercial (Kolb *et al.*, 2012), esta especie aún permanece subexplotada. La composición química destaca netamente el contenido de citral (69,8 - 77,0 %): geranial (47,0 - 51,7 %), neral (22,8 - 25,3 %), con importantes contenidos de acetato de geranilo (7,8 - 10,3 %), y linalol (5,0 - 6,2 %), siendo los minoritarios con

valores inferiores al 2,0 %: limoneno, metilheptenona, nerol, acetato de linalilo y α -terpineol (Rosselot *et al.*, 2018).

8. DESINFECTANTES

La desinfección es el conjunto de acciones mediante la cual, haciendo uso de procedimientos físicos o químicos, se reduce el número de microorganismos a un nivel seguro en ambientes, superficies y objetos inanimados. Es una medida de saneamiento y cumple la función de eliminar los agentes patógenos y de modificar las condiciones ambientales para interrumpir la cadena epizootica, ayudando así a la preservación de la salud de los animales (OIRSA, 2021). Se ha tenido el concepto de que los desinfectantes usados en sanidad animal son altamente tóxicos, contrario a los desinfectantes que se utilizan en la industria agroalimentaria, que no lo son y sus concentraciones también son muy distintas. Los desinfectantes modernos se han ido adaptando a las necesidades y sus composiciones son más completas, que incluyen compuestos no solamente biocidas; sino también surfactantes que favorecen la penetración de las sustancias activas. Estas sustancias se usan a lo largo de toda la cadena de producción y transformación alimenticia durante la producción y ayudan a prevenir la propagación de enfermedades de los animales (Ospina, 2015). La desinfección es una herramienta apropiada para luchar contra enfermedades no transmitidas por vectores y que se transmiten por contacto con fluidos corporales y otros materiales presentes en corrales, cuadras, establos, suelos, vehículos o equipos. La mayoría de estas enfermedades son causadas por bacterias, hongos, parásitos y virus, que pueden sobrevivir en el medio ambiente fuera del cuerpo de los animales. Incluyen las infecciones bacterianas entericas y respiratorias, las clostridiales y entre otras la tuberculosis y la brucelosis (OIRSA, 2021).

8.1. FACTORES QUE PUEDEN COMPROMETER LA EFICACIA DE LOS DESINFECTANTES

La limpieza previa a la aplicación de desinfectantes es un paso crucial dentro del proceso de limpieza y desinfección. La eficacia de un desinfectante también depende de los organismos que se quieren combatir, de su modo de multiplicación y de su resistencia al medio ambiente y a las sustancias químicas. La concentración del desinfectante, el tiempo de contacto con las superficies, y la temperatura ambiente, son otros factores a considerar (Hernández-Navarrete, 2014; OIRSA, 2021). Sin embargo, la presencia o no de materia orgánica extrajera es un factor preponderante que determina el éxito de cualquier operación de desinfección, pues esta materia diluye y neutraliza rápidamente las sustancias químicas biocidas. Por esta razón, se debe cepillar vigorosamente y baldear con abundante agua las superficies antes de aplicar los desinfectantes. Esta limpieza prudente y minuciosa es imprescindible, y nunca podrá ser reemplazada, ni por una mayor cantidad de desinfectante ni por la aspersión en alta presión. (Ministerio de Trabajo Empleo y Seguridad Social, 2021). Por ello, los

desinfectantes y los métodos de desinfección deberán elegirse en función de los agentes infecciosos considerados y la índole de los locales, los vehículos y los objetos que hay que someter a tratamiento (OMSA, 2023).

8.2. CLASIFICACIÓN

Los desinfectantes se clasifican por su naturaleza química y cada clase tiene sus características, peligros, toxicidades y eficacia únicos contra varios microorganismos (Dvorak, 2008). A continuación se describen las principales clases de desinfectantes químicos y sus características.

8.2.1. Ácidos

Los desinfectantes ácidos funcionan destruyendo los enlaces de los ácidos nucleicos y precipitando las proteínas. Los ácidos también cambian el pH del ambiente haciéndolo perjudicial para muchos microorganismos (Maris, 1995). Las soluciones concentradas de ácidos pueden ser cáusticas, causar quemaduras químicas y pueden ser tóxicas en altas concentraciones en el aire. Estas características limitan su uso. La actividad antimicrobiana de los ácidos depende en gran medida del pH. Los ácidos tienen un uso definido, pero limitado como desinfectantes.

El ácido acético generalmente se vende como ácido acético glacial (95 % de ácido acético) que luego se diluye con agua para obtener una concentración de solución de trabajo del 5 %. La forma concentrada es corrosiva para la piel y los pulmones, pero la dilución típica (5 %) se considera no tóxica y no irritante. El ácido acético generalmente se aplica rociando, rociando o sumergiendo un artículo en una solución diluida. El vinagre doméstico es una solución de ácido acético al 4-5 % (por volumen). El ácido acético tiene poca actividad en presencia de materia orgánica (Morley, 2002).

8.2.2. Alcoholes

Los alcoholes son agentes antimicrobianos de amplio espectro que dañan los microorganismos al desnaturalizar las proteínas, causando daño a la membrana y lisis celular (Ewart, 2001). Los alcoholes se utilizan para la desinfección de superficies, lociones antisépticas tópicas y desinfectantes para manos. Los alcoholes se consideran de acción rápida capaces de matar a la mayoría de las bacterias dentro de los cinco minutos posteriores a la exposición, pero tienen una actividad virucida limitada y son ineficaces contra las esporas. El etanol se considera virucida; el isopropanol no es eficaz contra los virus no envueltos.

Una consideración importante con los alcoholes es la concentración utilizada, siendo óptima 70-90 %, ya que se mejora la penetración en el protoplasma bacteriano. Las concentraciones más altas (95 %) son en realidad menos efectivas porque se

requiere cierto grado de agua para la eficacia (Ewart, 2001; Quinn y Markey, 2001). Los alcoholes se evaporan rápidamente pero no dejan residuos. La actividad de los alcoholes está limitada en presencia de materia orgánica. Los alcoholes son altamente inflamables, pueden dañar el caucho y el plástico y pueden ser muy irritantes para la piel lesionada (Ewart, 2001, Morley, 2002).

8.2.3. Aldehídos

Los aldehídos son desinfectantes de amplio espectro altamente efectivos, que generalmente logran la esterilización al desnaturalizar las proteínas y alterar los ácidos nucleicos (Ewart, 2001; Maris, 1995). Los agentes más utilizados son el formaldehído y el glutaraldehído (Quinn y Markey, 2001). Los aldehídos no son corrosivos para los metales, el caucho, el plástico y el cemento, y son efectivos contra bacterias, hongos, virus, micobacterias y esporas (Jeffrey, 1995; Morley, 2002). Estos químicos son altamente irritantes, tóxicos para humanos o animales por contacto o inhalación, y son potencialmente cancerígenos; por lo que su uso es limitado (Quinn y Markey, 2001; Green, 1998). Si se usan estos productos químicos, se debe usar equipo de protección personal (es decir, guantes de nitrilo, botas resistentes a líquidos, protección para los ojos).

El formaldehído o formol se utiliza como desinfectante de superficies y fumigante y se ha utilizado para descontaminar superficies de madera, ladrillos y grietas de equipos electrónicos y mecánicos. (Ewart, 2001). La eficacia del formaldehído depende de la humedad relativa y la temperatura; lo óptimo es una humedad cercana al 70 % y una temperatura cercana a los 14 °C. La formalina es una solución al 37 % de formaldehído en agua (Dvorak. 2008).

El glutaraldehído es un bactericida de acción rápida y más potente que el formol frente a bacterias, virus y algunos hongos y esporas y se usa principalmente como desinfectante para equipos médicos (por ejemplo, endoscopios), pero puede proporcionar esterilización en tiempos de contacto prolongados (Ewart, 2001). Para la desinfección de alto nivel se utiliza una concentración del 2 % (Quinn y Markey, 2001). Su eficacia depende en gran medida del pH y la temperatura, y funciona mejor con un pH superior a 7 y temperaturas altas. Se considera más eficaz que el formaldehído en presencia de materia orgánica, jabones y aguas duras (Quinn y Markey, 2001; Green, 1998).

8.2.4. Álcalis

Los agentes alcalinos funcionan saponificando los lípidos dentro de las envolturas de los microorganismos (Maris, 1995). La actividad de los compuestos alcalinos es lenta, pero puede incrementarse elevando la temperatura. Los álcalis tienen buenas propiedades microbicidas, pero son agentes muy corrosivos y se deben utilizar elementos de protección personal (Jeffrey, 1995).

El hidróxido de sodio (sosa cáustica) es un álcali fuerte que se usa para desinfectar edificios, pero es altamente cáustico. Se debe usar ropa protectora, guantes de goma y anteojos de seguridad al mezclar y aplicar el producto químico. El hidróxido de sodio siempre debe agregarse cuidadosamente al agua. Nunca vierta agua en hidróxido de sodio; se producirá una reacción muy violenta, así como la producción de calor intenso que puede derretir los envases de plástico. El hidróxido de sodio es corrosivo para los metales. Se considera un desinfectante eficaz contra la fiebre aftosa (Dvorak. 2008).

El hidróxido de amonio es un desinfectante eficaz contra los quistes de coccidios, sin embargo, las soluciones fuertes emiten vapores intensos. Esta sustancia no se considera eficaz contra la mayoría de las bacterias. La desinfección general debe seguir al uso de este compuesto (Quinn y Markey, 2001).

El carbonato de sodio se ha utilizado en una solución caliente (82 °C) para desinfectar edificios que albergan animales con fiebre aftosa. Es más efectivo como limpiador que como desinfectante, ya que carece de eficacia contra algunas bacterias y la mayoría de los virus (Quinn y Markey, 2001). Tiene poca actividad en presencia de material orgánico y puede desactivarse con agua dura. Puede ser irritante y requiere ropa protectora y es dañino para la vida acuática.

El óxido de calcio (cal viva) se convierte en cal cuando se mezcla con agua. Esto tiene efectos biocidas sobre algunas bacterias y virus y, a veces, se esparce por el suelo después de la despoblación de las instalaciones infectadas y también se ha utilizado para retardar la putrefacción de los cadáveres enterrados después de la despoblación. (Dvorak. 2008).

8.2.5. Biguanidas

Las biguanidas son perjudiciales para los microorganismos al reaccionar con los grupos cargados negativamente en las membranas celulares, lo que altera la permeabilidad (Quinn y Markey, 2001; Maris, 1995). Las biguanidas tienen un amplio espectro antibacteriano; sin embargo, tienen una eficacia limitada contra los virus y no son esporicidas, micobacteriocidas ni fungicidas (Quinn y Markey, 2001; Jeffrey, 1995). Las biguanidas solo pueden funcionar en un rango de pH limitado (5-7) y se inactivan fácilmente con jabones y detergentes. Estos productos son tóxicos para los peces y no deben descargarse al medio ambiente.

La clorhexidina es un derivado clorofenilbiguanídico, cuyo espectro de acción abarca bacterias gram positivas y gram negativas (más efectivo sobre las primeras), actuando sobre la membrana celular. Es esporostático sólo al elevar la temperatura, y también posee actividad sobre algunos hongos como *Candida* y algunos virus, siendo poco activo sobre micobacterias (Font, 2001).

8.2.6. Halógenos

Los compuestos halogenados son compuestos de amplio espectro que se consideran de baja toxicidad, bajo costo y fáciles de usar. Pierden potencia con el tiempo y no son activos a temperaturas superiores a los 43 °C o a pH altos (>9) (Jeffrey, 1995). Dado que estos compuestos pierden actividad rápidamente en presencia de desechos orgánicos, luz solar y algunos metales, deben aplicarse sobre superficies completamente limpias para su desinfección (Kennedy *et al.*, 2000; Shulaw, 2001; Green, 1998; Grooms, 2003).

Los compuestos de cloro funcionan a través de su naturaleza electronegativa para desnaturalizar proteínas (Maris, 1995) y se consideran de amplio espectro, siendo efectivos contra bacterias, virus con y sin envoltura, micobacterias y hongos. En concentraciones elevadas, los compuestos de cloro pueden ser esporicidas (Kennedy *et al.*, 2000; Grooms, 2003). El hipoclorito de sodio (NaOCl) es uno de los desinfectantes que contiene cloro más utilizados. El blanqueador de cloro comercial contiene hipoclorito de sodio al 5,25 % en solución acuosa y 50.000 ppm de cloro disponible (Grooms, 2003; Maris, 1995). La actividad biocida está determinada por la cantidad de cloro disponible de la solución. Las concentraciones bajas (2 a 500 ppm.) son activas contra bacterias vegetativas, hongos y la mayoría de los virus. Se puede obtener una acción esporicida rápida alrededor de 2.500 ppm, sin embargo, esta concentración es muy corrosiva, por lo que debe limitarse su uso. Las altas concentraciones también son irritantes para las mucosas, los ojos y la piel (Grooms, 2003; Kennedy *et al.*, 2000). Los compuestos de cloro se inactivan rápidamente con la luz y algunos metales, por lo que siempre se deben usar soluciones frescas. Los hipocloritos nunca deben mezclarse con ácidos o amoníaco, ya que esto provocará la liberación de cloro gaseoso tóxico (Shulaw, 2001).

Los compuestos de yodo son de amplio espectro y se consideran efectivos para una variedad de bacterias, entre ellas micobacterias, hongos y virus (Jeffrey, 1995). Los yodos funcionan desnaturalizando las proteínas para interferir con los sistemas enzimáticos de los microorganismos (Maris, 1995). Los yodos, a menudo, se formulan con jabones y se consideran relativamente seguros (Grooms, 2003). Los compuestos de yodo concentrado pueden ser irritantes para la piel, pueden manchar la ropa o dañar el caucho y algunos metales. Los agentes de yodo son inactivados por compuestos de amonio cuaternario y desechos orgánicos (Shulaw, 2001).

Los yodóforos son complejos de yodo que tienen una mayor solubilidad y una liberación sostenida de yodo. Uno de los yodóforos más utilizados es la povidona yodada. Son buenos para uso general y la materia orgánica los inactiva menos fácilmente que los compuestos de yodo elemental. La dilución de yodóforos en realidad aumenta la concentración de yodo libre y la actividad antimicrobiana (Dvorak, 2008).

8.2.7. Agentes oxidantes

Los agentes oxidantes son compuestos basados en peróxidos de amplio espectro que funcionan desnaturalizando las proteínas y los lípidos de los microorganismos (Maris, 1995). Los compuestos de peróxidos varían en su rango microbicida, pero se consideran efectivos en superficies y equipos duros. En su forma diluida, estos agentes son relativamente seguros, pero pueden ser irritantes y dañar la ropa cuando se concentran (Grooms, 2003).

El peróxido de hidrógeno en el hogar está en forma diluida (3-10 %), mientras que el uso industrial involucra soluciones concentradas (30 % o más). En una concentración del 5-20 %, el peróxido de hidrógeno se considera bactericida, virucida (los virus no envueltos pueden ser resistentes), fungicida y en altas concentraciones esporicida. Su actividad contra micobacterias es limitada (Jeffrey, 1995). Se inactiva fácilmente mediante las catalasas celulares.

El ácido peracético es un agente oxidante fuerte y es una formulación de peróxido de hidrógeno y ácido acético. Se considera bactericida, fungicida, esporicida y virucida (Quinn y Markey, 2001; Jeffrey, 1995). También es efectivo contra micobacterias y algas y tiene cierta actividad en presencia de materia orgánica.

8.2.8. Fenoles

Los fenoles son desinfectantes de amplio espectro que funcionan desnaturalizando las proteínas e inactivando las enzimas unidas a la membrana para alterar la permeabilidad de la pared celular de los microorganismos. Los fenoles pueden ser derivados del alquitrán de hulla o formulaciones sintéticas y generalmente tienen una apariencia lechosa o turbia cuando se agregan al agua, así como un fuerte olor a pino (Kennedy *et al.*, 2000; Shulaw, 2001; Grooms, 2003). Los fenoles se formulan normalmente en soluciones jabonosas para aumentar su poder de penetración y, en concentraciones del 5 %, se consideran bactericidas, tuberculocidas, fungicidas y virucidas para los virus envueltos (Jeffrey, 1995). Los fenoles no son efectivos contra virus sin envoltura y esporas y mantienen su actividad en agua dura y en presencia de materia orgánica, y tienen alguna actividad residual después del secado. Los desinfectantes fenólicos son generalmente seguros para los humanos, pero la exposición prolongada a la piel puede causar irritación (Kennedy *et al.*, 2000). Las concentraciones superiores al 2 % son altamente tóxicas para todos los animales, especialmente para los gatos. Existen muchos derivados del fenol: los alquilfenoles (timol, cresol, xilenol), los bifenoles (triclosan), nitrofenoles (ácido pícrico), fenolsalicílicos (ácido salicílico), fenoles con halógenos (hexaclorofeno) y polifenoles (resorcina, guayacol). El triclosán actúa sobre la membrana celular, impidiendo el aporte de nutrientes. Es activo frente a bacterias gram positivas y gram negativas (Dvorak, 2008). Por su parte, el cresol (tricresol) es una mezcla de los tres isómeros (orto, meta y para), con predominio del meta. Es hasta 10 veces más potente que el fenol y muy irritante, por lo que sólo se emplea como desinfectante para uso hospitalario y doméstico en solución jabonosa al 50 % (Dvorak, 2008).

8.2.9. Compuestos de amonio cuaternario

También conocidos como “quats” o QAC, estos compuestos son detergentes catiónicos que son atraídos por las superficies cargadas negativamente de los microorganismos, donde se unen de manera irreversible a los fosfolípidos en la membrana celular y desnaturalizan las proteínas, lo que afecta la permeabilidad (Maris, 1995). Los QAC pueden ser de diferentes “generaciones” según su química, siendo las generaciones posteriores más germicidas, menos espumantes y más tolerantes a las cargas orgánicas. Los QAC son altamente efectivos contra bacterias Gram positivas y tienen buena eficacia contra bacterias Gram negativas, hongos y virus envueltos. No son efectivos contra virus no envueltos o micobacterias y se consideran esporostáticos, pero no esporicidas (Kennedy *et al.*, 2000; Grooms, 2003; Jeffrey, 1995). Los QAC tienen algún efecto residual, manteniendo las superficies bacteriostáticas por un breve tiempo. Son más activos a pH neutro o ligeramente alcalino, pero pierden su actividad a pH inferior a 3,5. Los QAC se consideran estables en el almacenamiento, pero, en general, se inactivan fácilmente con materia orgánica, detergentes, jabones y agua dura (esto puede variar con la “generación”). Los QAC son tóxicos para los peces y no deben descargarse en fuentes de agua. El cloruro de benzalconio es bactericida o bacteriostático, según la concentración que se utilice. Es más activo frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas, también sobre algunos protozoos, hongos y virus. No tiene acción sobre esporas (Font, 2001).

9. BIOPELÍCULAS

Desde su evolución, las bacterias han existido en dos estados separados: el estado planctónico (flotación libre) y el estado sésil (adherido a una superficie) (Bjarnsholt *et al.*, 2013). Las bacterias exhiben rasgos diferentes entre estos dos estados porque la unión bacteriana a una superficie provoca un cambio rápido en los niveles de expresión de varios genes asociados con la maduración y producción de exopolisacárido (EPS), también conocido como “limo” o EPS bacteriano. Se produce una barrera protectora debido a esta transición, que comienza inmediatamente después de que las bacterias colonizan las superficies bióticas y abióticas (Bjarnsholt *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016). Esta barrera protege a las bacterias de los mecanismos de defensa naturales del huésped y de amenazas externas, como los antibióticos. Anthony van Leeuwenhoek observó por primera vez bacterias asociadas a la superficie, pero la palabra “biopelícula” no se utilizó ni se definió hasta un manuscrito de Costerton *et al.* en 1978. La importancia de las biopelículas fue reconocida por la Sociedad Estadounidense de Microbiología en 1993. Costerton *et al.* en 1999 caracterizaron más completamente la biopelícula como una población organizada de microbios encerrados en una matriz polimérica producida por el microbio que se adhiere a una superficie. Las biopelículas impactan todas las facetas de la vida humana, desde la salud pública hasta las preocupaciones industriales, e impactan la economía, el uso de energía, la degradación de los equipos, los productos contaminados y las infecciones. La microscopía de barrido confocal ha ayudado a los

científicos a comprender la estructura extraordinariamente intrincada de las biopelículas. El uso de estas tecnologías de vanguardia ha descubierto que las biopelículas son poblaciones complejas de células envueltas en una matriz de EPS con canales de agua permeables y depósitos uniformes de células y limo recolectado (Sharma *et al.*, 2023).

La comprensión moderna de este tema define las biopelículas como una estructura compleja inmóvil que comprende una o múltiples especies de bacterias, células huésped y subproductos celulares, con las células unidas irreversiblemente al sustrato y rodeadas por una sustancia polimérica extracelular producida por las bacterias. Una superficie que proporciona humedad y nutrientes es el entorno ideal para el desarrollo de biopelículas. El microorganismo que vive como parte de la biopelícula muestra rasgos característicos, como la cooperación colectiva, la captura de fuentes y una mayor supervivencia frente al tratamiento con antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2023). La complejidad de la actividad y el comportamiento de las biopelículas requieren investigación multidisciplinar para desarrollar una solución eficaz contra la devastación que puede causar esta estructura. En comparación con las biopelículas de una sola especie, las biopelículas de múltiples especies mostraron características nuevas a través de interacciones entre especies: mayor masa de biopelícula, mayor recuento de células de la comunidad, mayor actividad metabólica de los miembros de la comunidad, mayor tolerancia a los antimicrobianos y cambios en la organización y estructura espacial (Sadiq *et al.*, 2021).

Un aspecto muy importante de las biopelículas de *Salmonella* spp. en la producción avícola primaria es que pueden ser reservorios potenciales de este patógeno en las granjas y en las plantas de procesamiento de alimentos, avanzando así a través de la cadena alimentaria a través de la contaminación de los alimentos (Schonewille *et al.*, 2012). La adhesión de *Salmonella* spp. a las superficies de los alimentos fue el primer informe publicado sobre la biopelícula bacteriana transmitida por los alimentos (Duguid *et al.*, 1966). A pesar de las posibilidades de combate, es importante comprender que la propiedad de formación de biopelículas está en función de la adaptación al entorno del huésped. Dado que el biofilm también puede formar un hábitat para *Salmonella* spp. en entornos agrícolas y no solo en entornos de laboratorios, su control es de suma importancia para la mejora general de la seguridad alimentaria. Se debe prestar especial atención a los entornos que son notoriamente difíciles de descontaminar, por ejemplo, las fábricas de piensos y la producción avícola primaria (Schonewille *et al.*, 2012).

9.1. ESTRUCTURAS Y ETAPAS IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *SALMONELLA* SPP.

Las biopelículas son estructuras complejas de microorganismos y numerosos factores están involucrados en el proceso de formación, como el pH, la temperatura, el tipo de material y la rugosidad de la superficie, la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos, la condición de los flujos dinámicos, la presión osmótica, la concentración de oxígeno, la concentración y biodisponibilidad de nutrientes y presencia de agentes antimicrobianos en el medio (Donlan, 2002). Las características físicas de la superficie

sólida en la industria de procesamiento de alimentos son muy importantes para la formación de biopelículas porque influyen en la adherencia inicial, que depende de la tensión superficial crítica de la superficie sólida (Bryers, 1987). La secuencia de eventos en la formación de biopelículas en diferentes superficies está regulada por la expresión génica y la detección de quórum (Banerjee y Ray, 2016).

El modelo actual de formación de biopelículas se muestra en la **Figura 2**. El proceso comienza cuando las bacterias planctónicas se adhieren a la superficie en la unión inicial. En este paso, las bacterias que flotaban en el medio líquido se convirtieron en bacterias sésiles. Estas células adherentes poseen sólo una pequeña cantidad de sustancia polimérica extracelular (EPS) y muchas son capaces de moverse de forma independiente mediante movimientos espasmódicos o deslizantes mediados por flagelos. En esta etapa, la adhesión es reversible y muchas de las células pueden desprenderse de la superficie y volver al estilo de vida planctónico. En una segunda etapa, el cambio de unión reversible a irreversible es un cambio de una interacción débil de la bacteria con la superficie a una unión permanente con la presencia de EPS (Stoodley *et al.*, 2002). La monocapa adjunta comienza a crecer y forma una microcolonia. La producción de EPS ayuda a fortalecer el vínculo entre las bacterias y el sustrato y estabiliza la colonia de cualquier estrés ambiental. El biofilm se convierte en una estructura organizada que puede ser plana o con forma de hongo, según la fuente de nutrientes. Los genes específicos se expresan en esta etapa, incluidos los genes que codifican proteínas involucradas en la traducción, el metabolismo, el transporte y/o secreción de membrana y la regulación génica (Srey *et al.*, 2013). En esta etapa, la maduración se produce mediante la señalización de detección de quórum. Algunas bacterias del biofilm pueden disociarse y pasar al medio lo que genera la dispersión del biofilm (Latasa *et al.*, 2006; Shi y Zhu, 2009). La influencia externa puede desencadenar procesos internos del biofilm, como la degradación enzimática endógena o la liberación de EPS o proteína de unión a la superficie, y esto posiblemente provoque el desprendimiento del biofilm (Srey *et al.*, 2013).

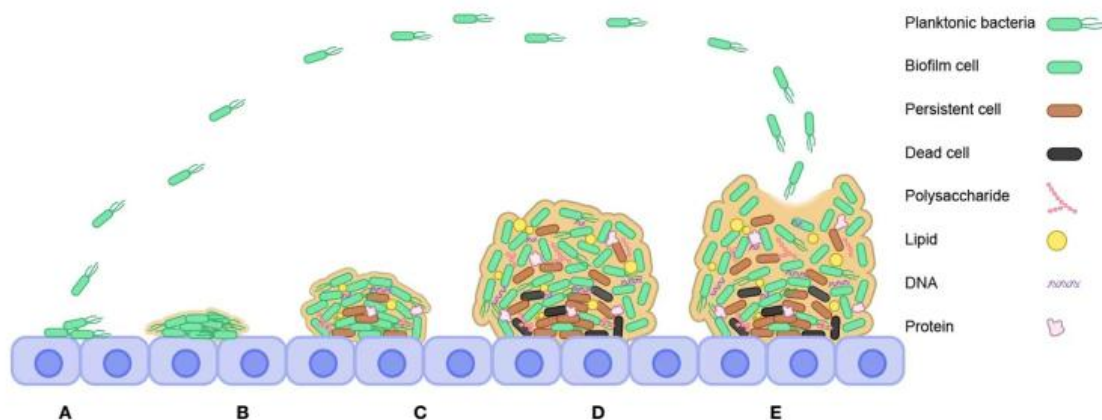


Figura 2. Etapas en la formación de biopelículas (Zhao *et al.*, 2023)
A Adhesión reversible; B Adhesión irreversible; C Las células bacterianas sintetizan y secretan sustancia polimérica extracelular (EPS); D Maduración; E Dispersión.

Los estudios han encontrado que los componentes de la superficie celular bacteriana, como la celulosa, los flagelos y las fimbrias, son importantes para la unión de *Salmonella* spp. a los productos frescos (Kroupitski *et al.*, 2009). Los flagelos son apéndices superficiales largos y delgados que se extienden hasta 20 μm y que son importantes para la motilidad y la quimiotaxis. Las bacterias usan flagelos para moverse a lo largo de la superficie de la planta antes de encontrar un sitio de unión favorable. Las fimbrias son apéndices proteicos finos, similares a cabellos, que contienen adhesinas en sus puntas con afinidad por diferentes moléculas de azúcar y pueden tener varios micrómetros de largo. La celulosa, que consta de unidades de glucosa unidas a β (1–4) secretadas por células bacterianas, puede dificultar la rotación flagelar y limitar la motilidad bacteriana. La producción tanto de fimbrias como de celulosa está regulada por el gen *csgD* en *Salmonella* spp. (Tan *et al.*, 2016).

Algunas estructuras son necesarias para el desarrollo de biopelículas en diferentes bacterias no relacionadas: exopolisacáridos (celulosa, poli- β -1,6-N-acetilglucosamina) para formar la matriz de biopelícula, que están reguladas por el mismo segundo mensajero c-di-GMP y un grupo de proteínas de superficie llamadas Bap (proteína asociada a biopelícula) para promover la adhesión a la superficie biótica y/o abiótica. Bap participa en el paso de unión primaria y en la agregación célula a célula en la maduración del biofilm (Latasa *et al.*, 2006). El papel de BapA es complementario al de las fimbrias en la conexión de células en *Salmonella* spp., ya sea fortaleciendo la interacción mediada por fimbrias o permitiendo las interconexiones de bacterias separadas por largas distancias. Aparentemente, es necesario mediar el reclutamiento bacteriano en la película de biopelícula. BapA se secreta a través de un sistema de secreción de proteínas de tipo I (BapBCD) situado aguas abajo del gen *bapA* y se encontró que estaba débilmente asociado con la superficie celular. BapA debe secretarse para el desarrollo de biopelículas. La expresión de *bapA* está coordinada con la de genes que codifican curli fimbriae y celulosa, mediante la acción de *csgD* (Latasa *et al.*, 2005). Tanto la síntesis de curli como la de celulosa están correguladas por una red reguladora compleja, en la que el regulador de tipo LuxR CsgD juega un papel clave (Römling *et al.*, 2000). CsgD también promueve la producción de celulosa a través de la transcripción de *adrA*, un gen que codifica un miembro de la familia de proteínas GGDEF involucrado en la activación postranscripcional de la síntesis de celulosa mediada por c-di-GMP (Römling *et al.*, 2000; Zogaj *et al.*, 2001; García *et al.*, 2004; Simm *et al.*, 2004). Las cepas de *Salmonella* spp. que no pueden sintetizar celulosa no pueden formar biopelículas y esto no puede compensarse con la sobreproducción de BapA (Latasa *et al.*, 2005).

Las mediciones de la expresión génica utilizando indicadores de luciferasa indicaron que la producción de fimbrias agregativas finas (Tafi) puede iniciar la formación de patrones superficiales de colonias característicos del morfotipo *rdar* (rojo, seco y rugoso) cuando se cultivan en medios que contienen rojo congo. Este morfotipo es un fenotipo multicelular caracterizado por fimbrias y formación de patrones de colonias mediadas por celulosa; lo que potencia la resistencia de *Salmonella* spp. a la desecación en ausencia de nutrientes (White *et al.*, 2006). El morfotipo *rdar* es el estado de biopelícula mejor caracterizado, es un comportamiento multicelular coordinado y

proporciona una ventaja de supervivencia a través de una mayor resistencia a la desecación y desinfección (White *et al.*, 2006), lo que permite que las células sobrevivan durante varios años (Apel *et al.*, 2009). Se supone que este morfotipo representa un estado más significativo en la transmisión de *Salmonella* spp. entre huéspedes (White y Surette, 2006). Además, está controlado principalmente por la expresión de los operones divergentes *agfDEFG* y *agfBAC* (*csgDEFG/BAC*), que codifican fimbrias agregativas delgadas (Tafi o curli) (Hammar *et al.*, 1995; White *et al.*, 2006). *AgfD* es un regulador positivo de la producción de Tafi al activar la transcripción de *agfB* y estimula la producción de celulosa mediante la activación transcripcional de *adrA* (Hammar *et al.*, 1995). La formación de biopelículas de *Salmonella* spp. aún no se comprende completamente en términos de predisposiciones genéticas y efectos de las condiciones ambientales. Teniendo en cuenta la cantidad de industrias afectadas negativamente por el desarrollo de biopelículas, es probable que la investigación en la formación de biopelículas mantenga el interés industrial en el futuro.

9.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS

Se han desarrollado numerosas metodologías basadas en diferentes aproximaciones para la detección y análisis de la formación de biopelículas por parte de microorganismos. Estas técnicas están dirigidas a evaluar viabilidad (cuantificación de células viables), componentes de matriz extrapolimérica (detección específica de sustancias extrapoliméricas, EPS) o biomasa (evaluación de EPS y bacterias, tanto vivas como muertas) (Peeters *et al.*, 2008).

La tinción con cristal violeta (CV) se utiliza para la detección y cuantificación de la biomasa del biofilm (Christensen *et al.*, 1985). El CV es un colorante proteico básico que tiñe las moléculas de superficie con carga negativa y la matriz extracelular de polisacáridos tanto de EPS como de células viables y muertas. Permite la cuantificación del biofilm total, sin distinguir células vivas y muertas (Pitts *et al.*, 2003). Esta tinción ha demostrado ser una técnica sencilla, rápida y económica para estudiar de forma rutinaria la formación de biopelículas. Sin embargo, la principal desventaja es su baja repetitividad, principalmente debido al desprendimiento y remoción de biomasa durante el paso de lavados para la eliminación de células y el colorante se desliga del biofilm (Gómez-Suárez *et al.*, 2001). Esta pérdida de biomasa puede reducirse mediante fijaciones con etanol absoluto, metanol o calentamiento (1 hora a 60 °C) antes de la tinción (Stepanović *et al.*, 2007). El método de enumeración de recuento de colonias (CCEM) es la técnica más utilizada para evaluar células vivas y se basa en la capacidad de las bacterias para la división celular inicial y forma colonias en medios de agar (Donlan y Costerton, 2002). Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones: por un lado, la fracción de células separadas del biofilm para hacer la enumeración podría no ser representativa de las células viables en el biofilm y, por el otro, el estrés ambiental puede inducir en las

bacterias un estado viable pero no cultivable, debido a alteraciones en el metabolismo (Shen *et al.*, 2010).

Existe una gran diversidad de técnicas utilizadas para la determinación de biopelículas entre las cuales se pueden nombrar los ensayos colorimétricos que utilizan sales de tetrazolio como 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5 Carboxanilida (Xu *et al.*, 2016; Riss *et al.*, 2013) y resazurina (Peeters *et al.*, 2008). También se utilizan diferentes técnicas de microscopía para la visualización y estudio de biopelículas. La microscopía de barrido láser confocal (CLSM) es probablemente la microscopía de fluorescencia más utilizada para estudiar biopelículas, lo que permite evaluar la estructura espacial de las biopelículas y visualizar la distribución de las células en la matriz de biopelículas (Neu y Lawrence, 2014) y la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se basa en la dispersión superficial y la absorción de electrones que logran una gran profundidad que produce una apariencia tridimensional y permite la visualización de biopelículas especiales conocidas y la distribución de bacterias y EPS dispersos en biopelículas (Hasan *et al.*, 2015). SEM se ha utilizado para estudiar la capacidad de las bacterias para desarrollar biopelículas en diferentes sustratos y varias condiciones ambientales (Pande *et al.*, 2016; De Oliveira *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, la formación de biopelículas es un proceso complejo regulado por varios conjuntos de genes involucrados en la producción y adhesión de la matriz extracelular. Se han realizado técnicas moleculares no solo para la detección de la formación de biopelículas, sino también para estudiar los mecanismos de regulación involucrados en la formación de biopelículas por parte de *Salmonella* spp. La expresión relativa de genes involucrados en la producción de curli, fimbrias y celulosa (csgD, csgB, adrA y bapA) ha permitido detectar la formación de biopelículas por *Salmonella* spp. en cáscaras de huevo (Pande *et al.*, 2016).

Debido a la problemática que representa la formación de biopelículas en la industria, se han desarrollado nuevas metodologías para su detección y estudio en esta área. La Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) es una metodología basada en la interferencia que se produce entre la luz reflejada y dispersada por la muestra (biopelícula) y la luz de referencia. Otra metodología, la técnica de imágenes hiperespectrales, se basa en la integración de señales de fluorescencia espectral obtenidas después de la radiación UV de la muestra y se ha utilizado para la detección de biopelículas de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en varias superficies (Jun *et al.*, 2010). Basados en esta tecnología, se han utilizado sistemas portátiles de imágenes hiperespectrales que detectan la fluorescencia en 3 longitudes de onda para monitorear la desinfección de superficies en la industria (Wiederoder *et al.*, 2013).

Existen diferentes productos comerciales para detectar biofilms en superficies abiertas y son una herramienta eficaz para el control de la higiene. Por ejemplo, BioFinder (Itram Higiene®), TBF® 300 y TBF® 300S (Betelgeux) son productos especializados para la detección de biofilm mediante una simple inspección visual basada en la muerte selectiva de la matriz exopolimérica del biofilm producida por diferentes tipos de

microorganismos. Gracias a su sencilla aplicación y tipo de respuesta, no requiere manipulación por parte de personal técnico (Itram Higiene, 2020, Betelgeux, 2020).

9.3. IMPORTANCIA DE LAS BIOPELÍCULAS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA

La eliminación de *Salmonella* spp. de los galpones de producción intensiva de huevos y pollos parrilleros es una tarea difícil (Davies y Breslin, 2003; Gradel *et al.*, 2005). Los principales riesgos de contaminación por *Salmonella* spp. de las parvadas de aves de corral pueden ser el estado de *Salmonella* spp. de la parvada anterior (Rose *et al.*, 2000); limpieza y desinfección ineficientes durante el período entre crianzas (Rose *et al.*, 2003; Davies y Breslin, 2003; Gradel *et al.*, 2005); presencia de *Salmonella* spp. en pollitos bebés (Cardinale *et al.*, 2004); cama (Rojas *et al.*, 2002), alimento y agua contaminada (Heyndrickx *et al.*, 2002); presencia de portadores contaminados (Davies y Breslin, 2003); roedores, moscas y escarabajos; y desinfección inadecuada de los camiones del matadero (Ramesh *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. confiere resistencia frente a varios factores de estrés que se encuentran tanto en el entorno del huésped como en el que no lo es. La industria avícola es intensiva y aplica consistentemente un sistema de todo dentro y todo fuera con el objetivo de minimizar la presión de infección y atacar organismos específicos como *Salmonella* spp. Por lo tanto, la desinfección durante las pausas de producción es una parte rutinaria del manejo de los galpones avícolas. Varios agentes químicos están disponibles comercialmente para la eliminación de *Salmonella* spp. Sin embargo, diferentes estudios revelaron que los métodos de limpieza y desinfección fueron ineficaces contra esta bacteria en una situación de campo (Ramesh *et al.*, 2002). Rose *et al.* (2000) y Davies y Breslin (2003) demostraron que, existe alta prevalencia de *Salmonella* spp. en muestras ambientales después de la limpieza y desinfección en galpones de gallinas ponedoras en Francia y Reino Unido, respectivamente, lo que demuestra que la desinfección fue ineficaz contra la bacteria en una situación de campo.

Las biopelículas pueden desempeñar un papel crucial en la supervivencia de *Salmonella* spp. en condiciones ambientales desfavorables, como en las granjas avícolas y los mataderos de pollos (Wang *et al.*, 2013). Pueden formar biopelículas en los alimentos producidos, y también en áreas de procesamiento y granjas avícolas, como paredes, pisos, tuberías y drenajes, y en superficies de contacto, como acero inoxidable, aluminio, nylon, caucho, plástico, poliestireno y vidrio (Steenackers *et al.*, 2012; Vivian, 2014). Las bacterias en biopelículas generalmente están bien protegidas contra el estrés ambiental y, como consecuencia, son extremadamente difíciles de erradicar, lo que contribuye a la resistencia y persistencia de las bacterias en las superficies. Varios autores han evaluado en el pasado la adhesión bacteriana y la subsiguiente formación de biopelículas por cepas de *Salmonella* spp. en superficies abióticas (Steenackers *et al.*, 2012). Sin embargo, muy pocos informes compararon la capacidad de formar biopelículas de los serotipos de *Salmonella enterica* aislados de aves de corral (Marin *et al.*, 2009;

Akinola *et al.*, 2020), y no se ha explorado la relación entre los parámetros cinéticos de crecimiento y la capacidad de formación de biopelículas.

Las células bacterianas en biopelículas expresan propiedades distintas de las células planctónicas, como una mayor resistencia a los biocidas y antibióticos a través de varios mecanismos, como la difusión reducida de las moléculas activas a través de la biopelícula debido a la matriz polimérica extracelular, alta concentración de bacterias en la biopelícula, modificación del estado fisiológico: disminución del metabolismo y de la tasa de crecimiento (la población que crece más lentamente puede ser más resistente), alteración de la permeabilidad de la membrana a través de la disminución de la síntesis de porinas, inducción de operones multirresistentes y de bombas de expulsión, sobreproducción de enzimas que degradan compuestos antimicrobianos y quiescencia (Høiby *et al.*, 2010; IFT, 2006; Lewis, 2008; Pan *et al.*, 2006; Shi y Zhu, 2009; Smith y Hunter, 2008). Aunque las bacterias dentro de las biopelículas son más resistentes a los biocidas y antibióticos, el vínculo entre el uso de biocidas contra las biopelículas bacterianas y la posible aparición de resistencia a los antibióticos no es sencillo (Jurgens *et al.*, 2008; Scenihr, 2009). La resistencia cruzada ocurre cuando un antimicrobiano selecciona (presión selectiva) genes que expresan mecanismos de resistencia comunes a diferentes grupos de antimicrobianos. La impermeabilidad de la barrera y las bombas de expulsión son los principales mecanismos implicados en la resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos (Thorrold *et al.*, 2007; Tkachenko *et al.*, 2007). Aunque varios autores reportan interacciones entre biopelículas bacterianas y el desarrollo de resistencia a antibióticos y biocidas, se dispone de muy poca información sobre la resistencia cruzada de bacterias sésiles a antibióticos y biocidas. Por ejemplo, se ha observado en cepas de *Salmonella* spp. resistencia cruzada entre aditivos (p. ej., nitrato de sodio) y tetraciclinas, provocada por una mayor expresión de bombas de expulsión (Potenski *et al.*, 2003). La protección cruzada ocurre cuando la adaptación a un antimicrobiano modifica la respuesta fisiológica de la bacteria (p. ej., disminuye su tasa de crecimiento), lo que resulta en una disminución temporal de la susceptibilidad a varios antimicrobianos no relacionados (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; IFT, 2006; Mah y O'Toole, 2001).

Durante el transporte, las aves pueden eliminar *Salmonella* spp. y, por lo tanto, contaminar los contenedores de transporte (Boonprasert *et al.*, 2014). Si los contenedores no se limpian y descontaminan adecuadamente después del transporte, los microorganismos depositados del viaje anterior pueden contaminar las parvadas posteriores transportadas en los mismos contenedores de transporte sucios. Por lo tanto, es necesario un sistema adecuado de limpieza y descontaminación de los contenedores de transporte de aves para garantizar que las aves no estén expuestas a patógenos en esta etapa del procesamiento. Varios agentes químicos están disponibles comercialmente para la eliminación de *Salmonella* spp. en una situación de suspensión o sin biopelícula. Sin embargo, la descontaminación de las superficies de los contenedores de transporte plantea un desafío diferente, ya que las células bacterianas están protegidas del desinfectante por materia fecal (húmeda o seca), si los contenedores de transporte no se limpian previamente de manera adecuada. Carr *et al.* (1999) encontraron que la mayoría de los desinfectantes eran ineficaces contra *Salmonella* spp. en una situación de campo,

debido a bacterias persistentemente adheridas y protegidas, probablemente en un estado de biopelícula. Debido a que la materia orgánica disminuye su eficiencia, existe una mayor demanda de desinfectante durante el proceso de descontaminación. Los desinfectantes más efectivos contra las células bacterianas en suspensión pueden no ser tan efectivos cuando se tratan células bacterianas incrustadas en una biopelícula. La presencia de biopelículas, así como la carga orgánica, aumentará la demanda del compuesto desinfectante (Maillard *et al.*, 2023).

9.4. RESISTENCIA DE BIOPELÍCULAS FRENTE A AGENTES QUÍMICOS

9.4.1. Desinfectantes

Se han realizado varios estudios para comparar la susceptibilidad entre el biofilm y las células planctónicas de *Salmonella* spp. frente a los desinfectantes químicos. Las biopelículas de *Salmonella* spp. en superficies de plástico, cemento y acero inoxidable son mucho más resistentes a los desinfectantes como el cloro y yodo en comparación con las células planctónicas (Joseph *et al.*, 2001). Se necesita exposición a una solución de 100 ppm de cloro o 50 ppm de yodo durante al menos 15 minutos (dependiendo de la superficie) para eliminar completamente las biopelículas, mientras que las células planctónicas mueren por completo después de la exposición a una solución de 10 ppm de cloro o yodo durante 10 o 5 min, respectivamente. Estos resultados han sido corroborados por Møretrø *et al.* (2009), quienes encontraron que los desinfectantes a base de hipoclorito (aproximadamente 400 ppm), glutaraldehído y tensioactivos catiónicos (alquilaminoacetato, cloruro de didecilmetilamonio y cloruro de benzalconio) no mostraron un efecto suficiente sobre las biopelículas de *Salmonella* spp. en superficies de acero inoxidable a las concentraciones recomendadas para el usuario después de 5 min de exposición, mientras que fueron efectivos contra *Salmonella* spp. en suspensión. Sin embargo, se encontró que la exposición a desinfectantes ácidos a base de peróxido y un producto que contenía 70 % de etanol elimina las biopelículas después de 5 minutos. Wong *et al.* (2010) describieron que las biopelículas de *Salmonella* spp. en clavijas de poliestireno también son menos susceptibles a los desinfectantes gluconato de clorhexidina, ácido cítrico, cloruro de benzalconio y otros compuestos de amonio cuaternario, en comparación con las células planctónicas. Sin embargo, se encontró que el hipoclorito de sodio erradica completamente las biopelículas en las clavijas de poliestireno después de 1 minuto de exposición a una concentración de aproximadamente 1.300 ppm, mientras que el etanol al 70 % no logró eliminar las biopelículas después de 5 minutos de exposición. Ramesh *et al.* (2002) concluyeron, a partir de un estudio comparativo del efecto de diferentes clases de desinfectantes (hipoclorito de sodio, clorito de sodio, amonio cuaternario, yodo, enzimas y fenol) sobre las biopelículas de *Salmonella* spp. en superficies de acero galvanizado, que un desinfectante a base de hipoclorito con una concentración de hipoclorito de sodio de 500 ppm fue el inhibidor de biopelícula más efectivo.

Se han realizado varios estudios para conocer la base mecánica del aumento de la resistencia de *Salmonella* spp. a los desinfectantes en biopelículas en comparación con las células planctónicas. Solano *et al.* (2002) compararon la influencia de 30 ppm de hipoclorito de sodio en la supervivencia de biopelículas de SE y mutantes de celulosa formados sobre vidrio. El 75 % de las células de tipo salvaje sobrevivieron a una exposición de 20 min al desinfectante, mientras que solo sobrevivió el 0,3 % de las células mutantes deficientes en celulosa, lo que indica claramente la función protectora de la celulosa. Además, Scher *et al.* (2005) informaron una mayor resistencia al hipoclorito de las células de ST formadoras de biopelícula en comparación con un doble mutante bcsA csgBA. La celulosa y el curli también parecen jugar un papel en la protección de estas bacterias en el perejil contra la cloración. Otros mecanismos, como la capacidad de penetrar en el tejido vegetal o biopelículas preexistentes y la producción de diferentes polisacáridos distintos de la celulosa, posiblemente también proporcionen y/o mejoren la protección contra este tratamiento (Lapidot *et al.*, 2006; Lapidot y Yaron, 2009). En referencia a ello, White *et al.* (2006) investigaron la influencia de 60 ppm de clorito de sodio en células planctónicas en fase estacionaria y colonias rdar de ST que se habían almacenado durante 3 meses en plástico y se encontró que las colonias secas de ST de tipo salvaje y una cepa mutante csgA deficiente en curli eran altamente resistentes (reducción de menos de 1 log después del tratamiento) en comparación con las células planctónicas (reducción de 6 log), mientras que las colonias mucoides de la cepa bcsA deficiente en celulosa resultaron ser susceptibles (reducción logarítmica de 4). Las colonias csgD fueron incluso más susceptibles (reducción logarítmica de 6), lo que indica que, además de la celulosa, los componentes adicionales regulados por csgD, además de curli, confieren protección contra el hipoclorito de sodio. Por otra parte, Stocki *et al.* (2007) hallaron que csgD también media la resistencia de las colonias rdar secas a un desinfectante a base de peróxido de hidrógeno, un desinfectante de amonio cuaternario y clorofenol, indica que la protección por los componentes de la matriz regulada por csgD parece ser un mecanismo general de resistencia. Tabak *et al.* (2007) estudiaron el efecto del desinfectante triclosán sobre *Salmonella* spp. planctónica (fases logarítmica y estacionaria), sobre células asociadas a biopelículas y sobre bacterias derivadas de biopelículas alteradas. Si bien se observó un fuerte efecto del triclosán (1000 µg/ml) en las células en fase logarítmica, se encontró un efecto menor e idéntico en las células derivadas de biopelículas y en fase estacionaria y solo se encontró un efecto débil en las células asociadas a biopelículas. La mayor resistencia de las células asociadas al biofilm en comparación con las células derivadas del biofilm sugiere que la matriz también juega un papel importante en la resistencia al triclosán. Esto se corroboró aún más con el hallazgo de que las delecciones en los genes que codifican para la síntesis de curli y celulosa hacen que la biopelícula sea más susceptible. Además, la resistencia al triclosán se atribuyó a una respuesta adaptativa específica del biofilm que se obtuvo mediante una expresión mejorada de acrAB (que codifica una bomba de expulsión) y marA (activador de acrAB), lo que resultó en un aumento de la expulsión de triclosán y de los genes de síntesis de celulosa bcsA y bcsE, lo que resultó en una mayor producción de EPS. Varios estudios encontraron que la resistencia adaptativa también juega un papel en la resistencia de las biopelículas de *Salmonella* spp. contra el cloruro de benzalconio

(Mangalappalli-Illathu y Korber, 2006; Mangalappalli-Illathu *et al.*, 2008). De hecho, las biopelículas adaptadas al cloruro de benzalconio por exposición a concentraciones subinhibitorias, durante un cierto período de tiempo, adquirieron la capacidad de sobrevivir a una exposición normalmente letal de cloruro de benzalconio y luego reanudar el crecimiento. La adaptación se produjo simultáneamente con la regulación positiva de proteínas claves involucradas en la respuesta al choque por frío, la respuesta al estrés, la desintoxicación y un aumento general en la biosíntesis de proteínas, lo que explica los mecanismos responsables de la resistencia adaptativa (Steenackers *et al.*, 2012).

9.4.2. Antibióticos

Además de una mayor resistencia a los desinfectantes, las biopelículas de *Salmonella* spp. también confieren resistencia a los antibióticos. Olson *et al.* (2002) compararon el efecto de los antibióticos enrofloxacina, gentamicina, eritromicina, tilmicosina, ampicilina, oxitetraciclina y trimetoprim-sulfadoxina sobre células planctónicas y sobre biopelículas preestablecidas en clavijas de poliestireno de aislados clínicos de ST y *Salmonella* ser. Bredeney y se encontró que las poblaciones planctónicas son sensibles (CIM <20 µg/ml para al menos 1 de los aislamientos) a todos los antibióticos excepto a la eritromicina y la tilmicosina, mientras que las biopelículas de *Salmonella* spp. solo son sensibles a la enrofloxacina y la ampicilina (S. ser. Bredeney solamente). Además, Tabak *et al.* (2009) informaron que las biopelículas de ST preformadas en microplacas son hasta 2.000 veces más resistentes a la ciprofloxacina en comparación con las células planctónicas. Esto es particularmente preocupante ya que la ciprofloxacina, junto con las cefalosporinas de tercera generación, como la ceftriaxona y la cefotaxima, se usa comúnmente para tratar infecciones por *Salmonella* no tifoidea (Parry y Threlfall, 2008). Por otro lado, Majtan *et al.* (2008) probaron el efecto de concentraciones subinhibitorias de gentamicina, ciprofloxacina y cefotaxima sobre la cantidad de biopelícula formada en microplacas de poliestireno por aislamientos clínicos de *Salmonella* spp. Si bien las sub-CIM de gentamicina y ciprofloxacina redujeron la cantidad de biopelícula formada por todos los aislamientos probados, se observó un aumento significativo en la formación de biopelícula y la producción de EPS con cefotaxima a ½ CIM en tres aislamientos. Estos resultados respaldan la idea de que los antibióticos no son solo armas bacterianas para combatir a los competidores, sino también moléculas de señalización que pueden regular las comunidades microbianas (Linares, *et al.*, 2006).

Por otro lado, Papavasileiou *et al.* (2010) investigaron 194 cepas de *S. enterica*, aisladas de niños infectados, por su capacidad para formar biopelículas en discos de silicona y compararon las biopelículas de las cepas aisladas con sus formas planctónicas correspondientes con respecto a la susceptibilidad a 9 agentes antimicrobianos. Alrededor del 56 % de las cepas pudieron formar biopelículas. Las biopelículas mostraron una mayor resistencia antimicrobiana a todos los antibióticos en comparación con las bacterias planctónicas, con las tasas de resistencia más altas para la gentamicina (90 %) y la ampicilina (84 %). Por otro lado, Miladi *et al.* (2017) evaluaron la susceptibilidad antibacteriana y la erradicación del biofilm del ácido nalidíxico en combinación con tres

compuestos naturales carvacrol, timol y eugenol , contra doce cepas de ST y mostró una erradicación de la biopelícula formada.

9.5. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

Dado que la producción de biofilm les confiere a las bacterias resistencia frente a los agentes desinfectantes, desarrollar estrategias para prevenir su formación en ambientes de industrias alimentarias es la mejor manera de erradicarlos (Coughlan *et al.*, 2016). Además de adoptar medidas de limpieza y desinfección más efectivas, debe tenerse en cuenta el diseño de instalaciones y equipos ya que tienen esquinas, grietas, válvulas y juntas inaccesibles, que son puntos vulnerables para la acumulación de biopelículas (Chmielewski y Frank, 2003). El uso de equipamiento adecuado junto con programas de higiene efectivos permite la eliminación de materiales no deseados, como microorganismos, residuos de desinfectantes y otros materiales (Dosti *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2006).

9.6. ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN

Una vez que el biofilm ya está establecido, la acción mecánica es una de las principales medidas para su eliminación o control (Maukonen *et al.*, 2003), porque la fricción actúa sobre la ruptura de la matriz, exponiendo capas más profundas y haciendo más accesibles los microorganismos. En general, los desinfectantes no penetran en la matriz de biopelículas después de un procedimiento de limpieza ineficiente y, por lo tanto, no destruyen toda la biopelícula (Simões *et al.*, 2006), alcanzando solo las capas externas. Por lo tanto, la limpieza es el primer paso para mejorar el saneamiento de los equipos e instalaciones (Hayes y Forsythe, 1998). Aunque la utilización de altas temperaturas puede reducir la necesidad de fuerzas mecánicas, se ha reportado que tratamientos a altas temperaturas no aumentan la eficiencia de eliminación de biopelículas (Marion-Ferey *et al.*, 2003). La erradicación de las biopelículas podría lograrse mediante la combinación de tratamientos con diferentes espectros y modos de acción (Bridier *et al.*, 2011). Con este objetivo, se han evaluado numerosos procesos, asociando químicos, tratamientos naturales o físicos. Por ejemplo, una combinación de triclosan y sales de amonio cuaternario o furanonas halogenadas, antibióticos/desinfectantes, y nano y microemulsiones han sido capaces de inhibir la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. (Steenackers *et al.*, 2012).

A su vez, se han desarrollado estrategias alternativas para su erradicación tales como la utilización de enzimas (Meireles *et al.*, 2016; Coughlan *et al.*, 2016), bacteriófagos Gutiérrez *et al.*, 2016; Harper *et al.*, 2014), inhibidores de los sistemas de comunicación (quorum sensing). El quorum sensing implica reconocimiento de moléculas de señalización dependiente de la densidad de bacterias, que resultan en la modulación de expresión génica (Skandamis y Nychas, 2012). La regulación de la expresión génica se

ha propuesto como componente esencial de la fisiología de los biofilms (Parsek y Greenberg, 2005). Ramos *et al.* (2010) han demostrado que sobrenadantes libres de células de bacterias ácido lácticas disminuyen las señales de *quórum sensing* (acyl homoserin lactonas) producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, un mecanismo utilizado por las bacterias para coordinar la formación de biofilms. Algunos investigadores han propuesto que la inhibición de la detección del *quórum* puede representar un antibiótico natural (Simões *et al.*, 2010). Varios inhibidores del quorum sensing, como las furanonas bromadas, han tenido éxito interfiriendo con la formación de biopelículas (Ni *et al.*, 2009; Sintim *et al.*, 2010).

9.6.1. Probióticos, bacterias ácido lácticas y bacteriocinas

El término probiótico es una palabra que significa “a favor de la vida” y se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. En la actualidad, se define como “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (Hill *et al.*, 2014). Las investigaciones sobre probióticos se han incrementado significativamente en los últimos años, principalmente aquellas orientadas a la aplicación en seres humanos y a la producción animal. En este sentido, el mayor consumo de probióticos por el hombre es en la forma de productos lácteos que contienen bacterias ácido lácticas y/o bifidobacterias. Además de estas bacterias, algunas levaduras poseen también propiedades benéficas, siendo el género *Saccharomyces* el más documentado (Abid *et al.*, 2022). En el caso de la producción animal, los probióticos pueden aportar beneficios en la mucosa y microbiota intestinal, disminuir el riesgo de infecciones y el desarrollo de enfermedades en el tracto digestivo y tener efectos beneficiosos sobre el sistema inmune. Los probióticos son ingeridos por las aves de corral y crean cambios fisiológicos en la estructura del tejido intestinal; esto provoca variaciones inmunológicas en el tracto gastrointestinal. Estos cambios inmunológicos aumentan la resistencia del animal a las bacterias patógenas (El Hack *et al.*, 2020).

Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos producidos por bacterias que tienen propiedades bactericidas contra cepas de la misma especie y otras especies relacionadas. Actúan generalmente destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros, lo que resulta en un desbalance de metabolitos o la disipación de la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Simons *et al.*, 2020,). El peróxido de hidrógeno es producido por las bacterias ácido lácticas constituyendo un mecanismo de defensa antimicrobiano no específico. Se ha comprobado que *Levilactobacillus* (ex *Lactobacillus*) *brevis*, *Ligilactobacillus* (ex *Lactobacillus*) *salivarius* y *Lactobacillus gasseri* productores de H₂O₂ que adhirieron a células epiteliales desplazando patógenos vaginales y co-agregan e inhiben el crecimiento de *Gardnerella vaginalis* (Mastromarino *et al.*, 2002). Los ácidos orgánicos tales como el láctico y el acético producidos durante el metabolismo de las bacterias lácticas han sido ampliamente considerados como factores antimicrobianos. Se ha demostrado que el sobrenadante de *L. casei* subsp. *rhamnosus*

inhibió el crecimiento de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y enteropatogénica (EPEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *ST*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium difficile* (Forestier *et al.*, 2001).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) formadoras de biofilms se han utilizado como estrategia para la competencia y exclusión de patógenos transmitidos por alimentos en entornos de procesamiento de alimentos (Göksel *et al.*, 2022). Ouali *et al.* (2014) mostraron que las biopelículas que forman bacterias lácticas funcionan como una barrera natural o un microorganismo de exclusión competitiva frente a microorganismos presentes en el ambiente de procesamiento de alimentos, incluyendo *Salmonella* spp. Varias investigaciones han mostrado que las bacterias ácido lácticas son capaces de formar biofilms de especies múltiples en varios nichos y pueden evitar la radicación de microorganismos patógenos de manera eficiente mediante mecanismos de competencia, antagonismo e inhibición. Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos que pueden ser producidos por las bacterias ácido lácticas y están implicados en la dinámica de los biofilms, permitiendo la absorción y desorción bacteriana, crear canales para el flujo de agua y nutrientes hacia zonas más profundas del biofilm y en el desprendimiento de las bacterias para formar biofilm en otros ambientes (Boles *et al.*, 2005). Se ha demostrado que estos biosurfactantes pueden tener actividad anti-adhesivas e inhibitorias de patógenos tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* y levaduras tales como *Candida* sp. (Rodrigues *et al.*, 2004, 2006a,b; Gudina *et al.*, 2010). Por otro lado, se han utilizado biofilms de las bacterias ácido lácticas, productores y no productores de bacteriocinas, como biofilms protectores para el control de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *ST* y *Escherichia coli* O157:H7 formadores de biofilms, encontrándose una disminución de hasta seis unidades logarítmicas en los recuentos de bacterias patógenas con respecto a los controles. Estos resultados sugieren que las BAL podrían ser utilizados como una alternativa para el control de la formación de biofilms de bacterias patógenas en la industria alimentaria, sin que esto implique un riesgo para los consumidores (Gómez *et al.*, 2016).

9.6.2. Proteínas de superficie y metabolitos

Las proteínas de la superficie bacteriana son estructuras que permiten la interacción entre ellas o con otras estructuras del medio. Están especialmente asociadas a fenómenos tales como autoagregación, floculación, colonización y formación de biofilms, ya que están involucradas en la adhesión a superficies bióticas como otras bacterias o células eucariotas y/o superficies abióticas. En general, las moléculas superficiales que están involucradas en la adhesión se denominan adhesinas. Estas adhesinas pueden encontrarse localizadas sobre la superficie de la pared celular, formando apéndices celulares proteicos como las fimbrias o formando la capa S. La capa S es una estructura regular ubicada sobre la superficie externa de la célula, formada por subunidades de proteína o glicoproteína que se autoensamblan formando una red cristalina bidimensional de 5 a 25 nm de espesor que cubre por completo al microorganismo durante todas las etapas del crecimiento (Sleytr *et al.*, 2001).

Se ha demostrado la presencia de proteínas de capa S en distintos *L. kefir* aislados de kefir (Garrote *et al.*, 2004). Mientras que algunas BAL como *L. kefir* presentan capa S cuyo tamaño puede variar, en otras especies como *L. plantarum* estas estructuras están ausentes. La capacidad de las BAL de adherirse a las superficies e incluso formar biofilm sumado con las proteínas superficiales con capacidad de autoensamblarse sobre diferentes superficies podrían ser utilizados como una estrategia alternativa de biocontrol de patógenos presentes en la industria alimentaria, especialmente aquellos capaces de formar biofilms, como *Salmonella* spp. Singh *et al.* (2018) estudiaron la propiedad antimicrobiana y la formación de biofilm de bacterias lácticas y los sobrenadantes libres de células sobre dos cepas patogénicas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Encontraron que los sobrenadantes de diferentes BAL presentaron inhibición en el crecimiento de los patógenos e inhibieron la formación de biofilm entre un 72-86 % y que las BAL disminuyeron la actividad metabólica de los patógenos estudiados. Dado que los sobrenadantes neutralizados también inhiben la formación de biofilm, aunque en menor grado, se cree que esta capacidad puede ser por efecto conjunto de los ácidos y compuestos proteicos (Singh *et al.*, 2018). Incluso se observa actividad anti-biofilm de las BAL tratados con calor y de sus sobrenadantes, sin encontrar diferencias significativas entre las células vivas y las muertas (Ciandrini *et al.*, 2017).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- El conocimiento de la incidencia de *Salmonella* spp. en granjas de pollos parrilleros, gallinas ponedoras y huevo fresco para consumo humano junto a la sensibilidad a los antimicrobianos de dichas bacterias proporcionará información objetiva sobre el estado de salud de las aves y las características microbiológicas del huevo producido en Entre Ríos. Estos datos permitirán conocer con mayor profundidad la epidemiología de esta bacteria.

OBJETIVO GENERAL

- Generar información sobre la susceptibilidad de las cepas regionales vigentes de *Salmonella enterica* frente a distintas sustancias antimicrobianas, seleccionadas por sus distintos mecanismos de acción y por su frecuente uso en la producción avícola nacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de *Salmonella enterica* serovariedades Enteritidis (SE), Typhimurium (ST) y Gallinarum (SG) en granjas de gallinas ponedoras y pollos parrilleros comerciales de las zonas de mayor concentración avícola de la provincia de Entre Ríos.
- Evaluar la eficacia de bacterias ácido lácticas probióticas seleccionados en la prevención de la formación de biopelículas en las cepas de *Salmonella* spp. que se aíslan en este estudio.
- Caracterizar las cepas de *Salmonella* spp. de mayor importancia en salud humana y avícola que se aíslan en este estudio con respecto a distintas sustancias antimicrobianas.
- Estudiar la relación entre la susceptibilidad a diferentes desinfectantes y la capacidad de producir biopelículas (biofilms) en las cepas de *Salmonella* spp. de mayor importancia en salud humana y avícola.

CAPÍTULO 1

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP. EN MUESTRAS DE GUANO DE AVES DE POSTURA

1. INTRODUCCIÓN

Una granja es un complejo sistema de nichos biológicos en los que las bacterias, como *Salmonella* spp., sobreviven y se multiplican (Guard-Petter, 2001). *Salmonella* spp. se ha adaptado y puede sobrevivir en una amplia gama de entornos diferentes, de modo que un gran número de infecciones humanas se asocian no sólo con fuentes de alimentos de origen animal, sino también con mascotas, reptiles, frutas, verduras, legumbres y otros seres humanos (Centros Control y Prevención de Enfermedades, 1997; Batz *et al.*, 2012). Los productos avícolas y asociados con las aves de corral son ampliamente reconocidos como uno de los vehículos más importantes para las infecciones humanas por esta bacteria (Batz *et al.*, 2012).

Los microorganismos del género *Salmonella* pueden ingresar a las granjas avícolas de diferentes maneras, como por ejemplo, a través del alimento o del agua de bebida, pollitos infectados de un día, animales domésticos, humanos, equipo (Gast, 2008; Shivaprasad, 2003; Gast, 2013). Una vez que la granja está contaminada, es muy difícil eliminar las *Salmonella* spp. del ambiente. Por otro lado, el ave que se infecta con este patógeno constituye el medio más importante de persistencia y diseminación del microorganismo (Shivaprasad, 2003). En las aves de corral, *Salmonella* paratifoidea corresponde a numerosos serotipos de *Salmonella* spp. móviles (no adaptados al huésped). Por el contrario, los biovares inmóviles de *Salmonella* spp. son específicos de huésped para las especies aviares y dan lugar a la pulorosis, causada por SP, y la tífosis aviar, causada por SG, enfermedades septicémicas agudas o crónicas que afectan con mayor frecuencia a los pollitos y aves adultas, respectivamente. Estas dos enfermedades han causado graves pérdidas económicas a los productores avícolas y han hecho que se pongan en práctica extensos programas de control y de erradicación (Gast, 2008). Las aves que sobreviven a la tífosis permanecen en la granja como portadoras *Salmonella* por materia fecal (Chacana y Terzolo, 2003; Shivaprasad, 2003).

Los serovares comúnmente asociados con infecciones humanas son SE y ST (Foley *et al.*, 2008). Con mayor frecuencia, las infecciones de *Salmonella* paratifoideas en pollos se caracterizan por la colonización sin signos clínicos en esos animales y en ocasiones persistente del tracto intestinal y los órganos internos, lo que puede conducir a la contaminación de la canal terminada. Además, SE es la principal serovariedad de *Salmonella* spp. asociada con infecciones relacionadas con huevos y sus productos derivados en el Reino Unido, la mayoría de los países europeos y América del Norte. Sin embargo, otras serovariedades también se han visto implicadas en una serie de brotes asociados con huevos (Threlfall *et al.*, 2014). Mientras que en Argentina, la salmonelosis (sólo fiebre tifoidea), como enfermedad transmitida por alimentos, es de notificación obligatoria, según la ley 15465/60. De acuerdo a la Agencia Gubernamental de Control de la ciudad de Buenos Aires, entre las bacterias más frecuentemente encontradas en casos de intoxicaciones alimentarias en dicha ciudad, *Salmonella* spp. se encuentra en el cuarto lugar (AGC, 2011). Caffer y Pichel (2006) evaluaron la situación epidemiológica de la salmonelosis en los brotes hospitalarios en Argentina, desde 1990 a 2005. Según este estudio durante ese período de tiempo, SE fue el serotipo más frecuente en humanos,

excepto durante dos años: 1991, año en el cual fue superada por ST y en 1992 por S. ser. Infantis. En el período 2007-2017, de acuerdo a datos obtenidos por el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella*, las serovariedades más prevalentes en humanos en nuestro país, fueron ST seguida por SE (Caffer, comunicación personal).

Las aves pueden permanecer portadoras durante largos períodos de tiempo, lo que plantea un problema importante en la producción avícola (Williams, 1981). La transmisión vertical de esta bacteria puede resultar en la contaminación interna o externa de los huevos. Las cáscaras de huevo a menudo se contaminan con *Salmonella* paratíficas por contaminación fecal durante la oviposición. La transmisión horizontal puede estar mediada por mecanismos que incluyen el contacto directo de ave a ave, la ingestión de heces o basura contaminadas, agua contaminada o por personal y equipo. Por tanto, el guano de las aves infectadas son fuente de bacterias, tanto en transmisión horizontal como vertical (Gast y Porter, 2020). Por lo tanto, el control de *Salmonella* spp. en aves de corral es crucial para el éxito de la industria avícola (Gama *et al.*, 2003). El Plan Nacional de Sanidad Avícola para *Salmonella* spp. en varios países se basa en el muestreo en los períodos de producción y cría utilizando muestras de guano y métodos de cultivo en el procedimiento de laboratorio, como referencia en ponedoras (Kyprianou, 2006; Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimiento, 2010; SENASA, 2016; USDA 2017).

Los métodos utilizados para aislar e identificar *Salmonella* spp. se basan en el preenriquecimiento en medios no selectivos, enriquecimiento selectivo, e inoculación en medios selectivos-diferenciales, y el posterior aislamiento e identificación bioquímica y serológica. Existen numerosos medios agarizados para el aislamiento de *Salmonella* spp. (Gast y Porter, 2020; Waltman y Gast, 2016) y se han realizado diversos estudios a fin de evaluar la capacidad de los métodos para la detección de esta bacteria en distintas matrices (Rybolt *et al.*, 2004; Myint *et al.*, 2006; Eriksson y Aspan, 2007; Love y Rostagno, 2008; Singer *et al.*, 2009). Algunos métodos de aislamiento demostraron que SE y ST se pueden recuperar a partir de una concentración inicial de $2,2 \times 10^0$ unidades formadoras de colonias (UFC)/25 g de guano, en muestras de aves de corral contaminadas artificialmente, a diferencia de las *Salmonella* spp. inmóviles que se recuperaron en concentraciones de $6,9 \times 10^2$ UFC/25g para SG y no se logró detectar para SP (Soria *et al.*, 2012). Existen una gran variedad de medios de cultivos y técnicas de aislamientos (Gast y Porter, 2020). Por ello, los objetivos del presente capítulo fueron:

- Comparar las técnicas de cultivo en términos de su capacidad para recuperar concentraciones bajas de *Salmonella* spp. en muestras de guano de gallinas de postura contaminadas artificialmente.
- Evaluar la capacidad discriminadora de las técnicas utilizadas mediante el cálculo de exactitud (EXA), sensibilidad (SE), especificidad (ESP), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de cada técnica y medio de cultivo agarizado selectivo-diferencial, y la concordancia entre ellos.
- Estudiar el aislamiento de *Salmonella* spp. inmóviles en muestras de guano estéril, contaminadas artificialmente con una cepa de *Escherichia coli* spp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. GUANO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON *SALMONELLA* SPP.

2.1.1. Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación

Las muestras de guano fueron obtenidas de granjas de gallinas ponedoras localizadas en la provincia Entre Ríos, Argentina. Antes de realizar los ensayos, cada muestra se analizó por cuatuplicado por el método utilizado por Soria *et al.*, (2012) para garantizar la ausencia de *Salmonella* spp. Además, se realizó el recuento de aerobios mesófilos totales, enterobacterias y hongos de las muestras. Para ello, se utilizó agar de tripteína de soja (ATS, Acumedia-Neogen), agar MacConkey (MC, Acumedia-Neogen) y agar Dicloran Rosa de bengala (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Este último con la adición de cloranfenicol (Anedra, China) a una concentración de 0,25 g/l.

2.1.2. Cepas de *Salmonella* spp. empleadas para los ensayos de inoculación

Las cepas de *Salmonella* spp. utilizadas en los ensayos de inoculación se detallan en la **Tabla 6**. Las mismas provienen de las colecciones del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce, del Laboratorio de Sanidad Aviar del INTA EEA Concepción del Uruguay y de las colecciones de cultivo de Estados Unidos (ATCC, American Type Culture Collection). Cada cepa de *Salmonella* spp. se activó a partir de agar nutritivo (Acumedia-Neogen) y se incubó durante 18-24 h en caldo tripteína de soja (CTS, Acumedia-Neogen) a 35 ± 2 °C. La pureza de los cultivos se confirmó por inoculación en MC y AST. El número de microorganismos viables se calculó por el método de Miles *et al.* (1938) y se expresó como UFC/ml. Las células fueron sedimentadas por centrifugación en una centrífuga de mesa a $302 \times g$ durante 15 min a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó dos veces con solución fisiológica estéril (NaCl al 0,85 % m/v). Finalmente, la cepa bacteriana se resuspendió en 5 ml de solución fisiológica estéril.

2.1.3. Determinación de las bacterias dañadas

Para conocer la verdadera concentración de las cepas que se inocularon en los ensayos, se determinó el daño natural de las bacterias mediante recuento en placas en ATS y MC. En el primer medio se contaron las células totales (dañadas y no dañadas); y en MC se contaron las células no dañadas. El daño celular se expresó como la proporción de células dañadas sobre el total de la población total (Liao y Fett, 2003):

$$\text{Daño celular (\%)} = \frac{\text{UFC/ml en ATS} - \text{UFC/ml en MC}}{\text{UFC/ml en ATS}} \times 100$$

Tabla 6. Cepas de *Salmonella* spp. utilizadas en los ensayos de inoculación

<i>Salmonella</i> spp.	Origen y/o colección de cultivo
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	Guano de ave, INTA EEA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	Colección de cultivo de los Estados Unidos
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 13311	Colección de cultivo de los Estados Unidos
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	Huevo, INTA EEA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	INTA EEA Balcarce
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	Huevo, INTA EEA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	INTA EEA Balcarce
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	Colección de cultivo de los Estados Unidos

2.1.4. Preparación de los inóculos de *Salmonella* spp. en muestras de guano de aves de postura

En una bolsa estéril para homogeneizadores tipo Stomacher® se pesaron 25 g de guano comprobadamente libre de bacterias del género *Salmonella* spp. Una vez que las cepas a estudiar fueron cultivadas, tal como se describió en el punto 2.1.2., se realizaron diluciones seriadas al décimo de cada una en solución fisiológica estéril. A cada una de las bolsas se le inoculó 1 ml de diluciones de las diferentes cepas de *Salmonella*. Las diluciones inoculadas estuvieron entre $1,0$ y $2,2 \times 10^8$ UFC/25 g de las diferentes cepas de *Salmonella* spp. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, por lo que se consideraron 3 muestras de cada dilución para cada cepa de *Salmonella* spp. en los ensayos. Teniendo en cuenta las diferentes técnicas a utilizar y que las mismas se realizaron por triplicado, se construyeron un total de 384 muestras de guano inoculadas con las diferentes diluciones de las *Salmonella* spp. a ensayar. A su vez para cada conjunto de prueba se realizaron en paralelo, como controles negativos, 3 muestras sin inocular la cepa en estudio.

2.1.5. Recuperación de las cepas de *Salmonella* spp. en el guano inoculado

La **Figura 3** muestra el diagrama de flujo de las cuatro técnicas diferentes que se realizaron para la detección de *Salmonella* spp. en guano de ave. Las muestras de guano que habían sido previamente contaminadas con diferentes concentraciones de *Salmonella* spp. se preenriquecieron en 225 ml de agua de peptona bufferada (APB, Merck, Darmstadt, Alemania), las mismas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 4-6 h. Posteriormente, por un lado se transfirió 1 ml del cultivo a 10 ml de caldo tetrationato

(Acumedia-Neogen) adicionado con 20 ml/l de solución iodo-ioduro de potasio (6 g de iodo; 5 g de ioduro de potasio; 20 ml de agua desmineralizada), solución verde brillante (0,1 %, Sigma, Steinheim, Alemania) y 40 mg/ml de novobiocina (Sigma, Steinheim, Alemania). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (TT). Por otro lado, se transfirió 1 ml del caldo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo tetrionato base Hajna (Acumedia), suplementado con 40 ml/l de solución de yoduro de potasio yodado (8 g de yodo, 5 g de yoduro de potasio, 40 ml de agua desmineralizada) y 40 mg /ml de novobiocina (Sigma) y se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (TTH). A su vez, se inocularon 3 alícuotas de 30 μl del cultivo preenriquecido en medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV, Acumedia-Neogen) suplementado con 1 ml por litro de una solución de novobiocina (Sigma, Steinheim, Alemania) al 2 %. Las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (MSRV). Paralelamente, se enriquecieron las muestras contaminadas artificialmente con 225 ml de caldo tetrionato (Acumedia-Neogen) adicionado con 20 ml/l de solución iodo-ioduro de potasio (6 g de iodo; 5 g de ioduro de potasio; 20 ml de agua desmineralizada), solución verde brillante (0,1 %, Sigma, Steinheim, Alemania) y 40 mg/ml de novobiocina (Sigma, Steinheim, Alemania). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (TTD).

En las cuatro técnicas se procedió a realizar la inoculación en los medios sólidos selectivos diferenciales, en los casos que se repicara desde el caldo se tomó una ansada del mismo y se realizó la inoculación por agotamiento en agar entérico Hektoen (HE; Acumedia-Neogen), agar *Salmonella-Shigella* (SS; Merck) y agar sulfito bismuto (SB; Acumedia-Neogen), mientras que para el caso que se repicó a partir de MSRV se tomó desde el centro de la alícuota sembrada y, de existir, de la zona turbia que se extiende desde la gota inoculada (periferia) inoculándose en los mismos medios sólidos selectivos diferenciales. En todos los casos se las incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Finalmente, se tomaron, al menos, 2 colonias sospechosas de *Salmonella* spp. por cada placa de agar selectivo-diferencial y se confirmaron mediante pruebas bioquímicas utilizando TSI (Britania), LIA (Acumedia-Neogen), agar citrato Simmons (Merck), SIM (Merck), agar tartrato de Jordan, agar fenilalanina (Hi-Media, Mumbai, India) y agar urea (Britania).

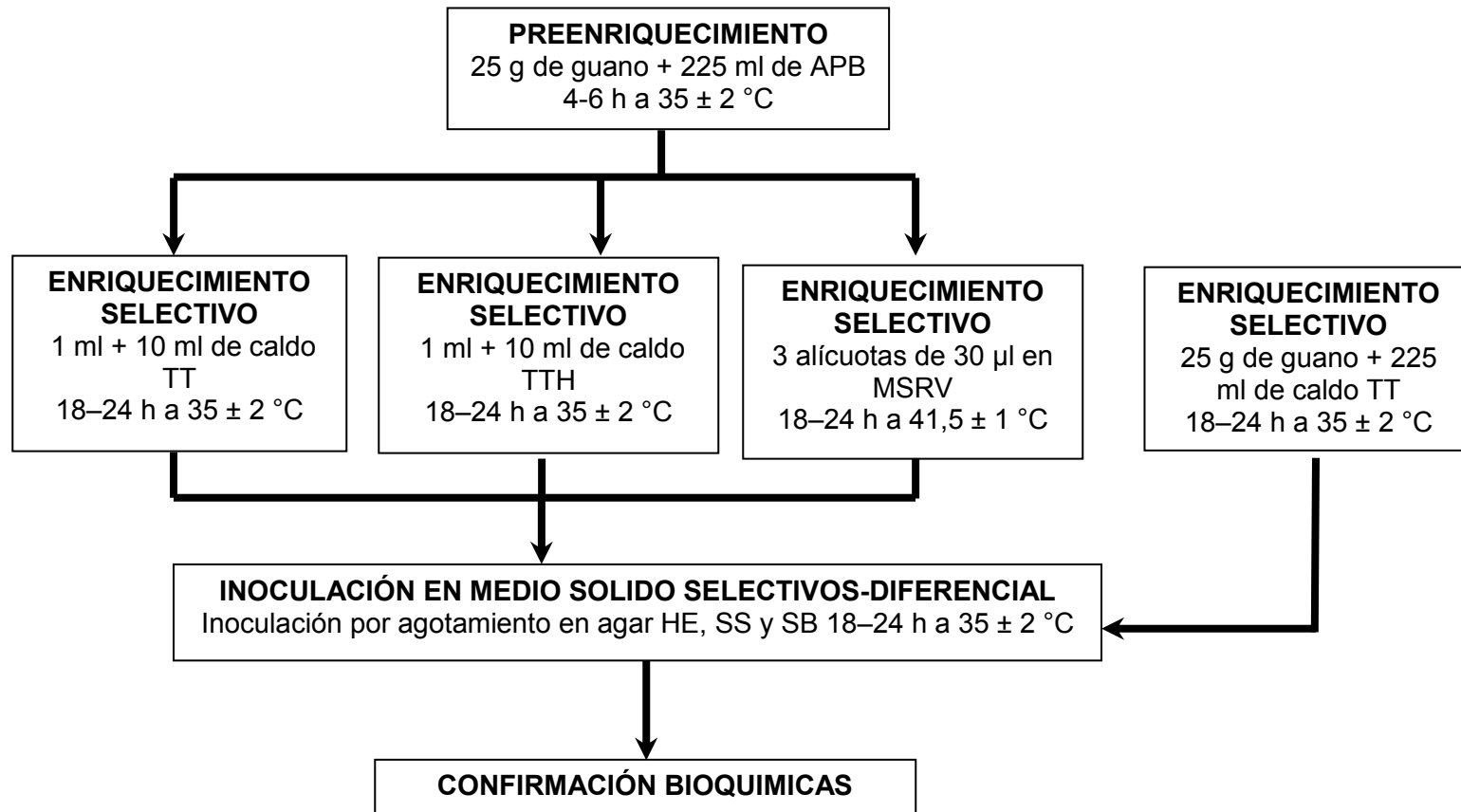


Figura 3. Diagrama de flujo para el aislamiento de *Salmonella* spp. en muestras de guano por 4 técnicas diferentes (MSRV, TTH, TT, y TTD)

APB= agua de peptona bufferada; MSRV= medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado; TT= caldo Tetrionato; TTH= Caldo Tetrionato Hajna; SS= agar *Salmonella Shigella*; HE= agar entérico Hektoen; SB= agar sulfito bismuto

2.1.6. Criterios de capacidad discriminatoria y límite de detección de las técnicas y medios de cultivos utilizados para la recuperación de *Salmonella* spp.

Una muestra positiva en al menos uno de los medios selectivos-diferenciales utilizados se consideró positiva para los métodos bacteriológicos empleados. El límite de detección de las técnicas se definió como la menor dilución en la cual cada cepa de *Salmonella* spp. pudo ser recuperada. Para realizar el análisis estadístico se definieron los siguientes índices:

- Verdaderos positivos (VP): la muestra fue definida como tal cuando fue positiva a *Salmonella* spp. en al menos un medio de cultivo selectivo-diferencial utilizado.
- Verdaderos negativos (VN): la muestra fue definida como tal cuando fue negativa a *Salmonella* spp. en todos los medios de cultivos selectivos-diferenciales utilizados.
- Falso negativo (FN): la muestra se definió como tal cuando *Salmonella* spp. no fue detectada por un medio de cultivo selectivo-diferencial en una muestra donde fue aislada por otro medio de cultivo selectivo-diferencial.
- Falso positivo (FP): la muestra fue definida como tal cuando *Salmonella* spp. fue detectada en una muestra donde no había esta bacteria.

De esta forma los parámetros estadísticos relativos realizados fueron determinados por las siguientes fórmulas (Soria *et al.*, 2017):

- Exactitud (Exa) es la capacidad para clasificar correctamente muestras conteniendo *Salmonella* spp. como positiva, y muestras que no contienen *Salmonella* spp. como negativa.

$$\text{Exa} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}}$$

- Sensibilidad (Sen): es una medida de la capacidad para clasificar una muestra conteniendo *Salmonella* spp. como positiva para este microorganismo.

$$\text{Sen} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

- Especificidad (Esp): es una medida de la capacidad para clasificar una muestra que no contiene *Salmonella* spp. como negativa para este microorganismo

$$\text{Esp} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

- Valor predictivo negativo (VPN): es una medida de la probabilidad que una muestra con resultado negativo para *Salmonella* spp. sea correctamente determinada.

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}}$$

- Valor predictivo positivo (VPP): es una medida de la probabilidad que una muestra con resultado positivo para *Salmonella* spp. sea correctamente determinada.

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

Para comparar los resultados de los aislamientos para todas las muestras analizadas, se usó la prueba de hipótesis para diferencia de proporciones, asumiendo que todos los valores eran igualmente probables. Cada valor de Exa, Sen, Esp, VPP y VPN de la prueba fueron informados con sus respectivos intervalos, con un nivel de confianza del 95 %. Los datos fueron analizados mediante el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2014). Los valores informados definieron el límite de un intervalo que, con un 95 % de seguridad, contenían los verdaderos valores de Exa, Sen, Esp, VPP y VPN. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de $p < 0,05$.

2.1.7. Concordancia de las técnicas y medios de cultivos utilizados para la recuperación de *Salmonella* spp.

Para evaluar la concordancia del aislamiento entre los diferentes medios agarizados selectivos-diferenciales para la detección de *Salmonella* spp. en los diferentes tipos de muestras estudiadas se utilizó el coeficiente Kappa (Martin, 1977) y la prueba de McNemar. El estadístico Kappa fue calculado para evaluar el grado de concordancia para clasificar las muestras como positivas o negativas más allá del azar (Dawson y Trapp, 2004). El nivel de concordancia se determinó comparando el valor obtenido con la escala de valores predeterminados: 0,93 a 1,00 (concordancia excelente); 0,81 a 0,92 (muy buena concordancia); 0,61 a 0,80 (concordancia buena); 0,41 a 0,60 (concordancia débil); 0,21 a 0,40 (concordancia ligera); 0,01 a 0,20 (concordancia pobre) y menor a 0,01 (concordancia nula). La prueba de McNemar se calculó utilizando una aproximación de chi-cuadrado a $p < 0,05$ (GraphPad Software, 2023).

2.1.8. Análisis estadístico

Los recuentos bacterianos en MC y ATS fueron comparados a través de una prueba de análisis de varianza de una vía para determinar el efecto de los medios de cultivos sobre las poblaciones bacterianas. Para comparar los resultados de todos los ensayos, se realizó una prueba de hipótesis para una diferencia de proporciones utilizando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2014). Los valores informados definieron los límites de un intervalo que, con una certeza del 95 %, contenían el valor real de EXA, Se, PPV o NPV. Los resultados sólo se consideraron estadísticamente diferentes con $p < 0,05$. Los parámetros de EXA, SE, VPP y VPN de la prueba se informaron bajo el supuesto de que todos los valores son igualmente probables. Además, se utilizó la prueba Z para probar la significancia estadística de los coeficientes kappa. Por otro lado, la prueba de McNemar se calculó usando una aproximación de chi-cuadrado a $p < 0,05$ (GraphPad Software, 2023).

2.2. GUANO ESTERIL CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON *SALMONELLA* SPP. INMÓVIL Y *ESCHERICHIA COLI*

La presencia de microorganismos de la microbiota acompañante en la muestra de guano, puede incidir en la detección de *Salmonella* spp. debido a la competencia por los nutrientes, enmascaramiento del crecimiento, un comportamiento similar para la prueba efectuada o la liberación de compuestos que inhiben el crecimiento del microorganismo de interés, es por ello que se diseñó el ensayo con cepas de *Salmonella* spp. inmóvil y *E. coli* spp. en diferente relación de concentración. Se seleccionó *E. coli* debido a que se usa como indicador de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras.

2.2.1. Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación

Las muestras de guano fueron obtenidas de granjas de gallinas ponedoras localizadas en la provincia Entre Ríos, Argentina. Las mismas fueron sometidas a la esterilización a través de calor húmedo, utilizando un autoclave (30 minutos a 1 atm de presión).

2.2.2. Cepas empleadas para los ensayos de inoculación

Las cepas utilizadas en los ensayos de inoculación, se detallan en la **Tabla 7**. Las mismas provienen de las colecciones del Laboratorio de Bacteriología del INTA EEA Balcarce y del Laboratorio de Sanidad Aviar del INTA EEA Concepción del Uruguay. Cada cepa se activó tal como se describió en el punto 2.1.2.

Tabla 7. Cepas utilizadas en los ensayos de inoculación.

<i>Salmonella</i> spp.	Origen y/o colección de cultivo
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	INTA EEA Balcarce
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	
<i>Escherichia coli</i> CUB 25/17	Medula ósea de ave, INTA EEA C. del Uruguay

2.2.3. Determinación de las bacterias dañadas

Se procedió de la misma forma que el punto 2.1.3.

2.2.4. Preparación de los inóculos de *Salmonella* spp. y *E. coli* en muestras de guano de aves de postura

En una bolsa estéril para homogeneizadores tipo Stomacher® se pesaron 25 g de guano esterilizado, una vez que las cepas a estudiar fueron cultivadas, según el punto

2.1.2. se realizaron diluciones seriadas al décimo de cada una en solución fisiológica estéril. A cada una de las bolsas se le inoculó 1 ml de diluciones de las diferentes cepas. Se realizaron diferentes combinaciones de cepas y concentraciones de inóculo inicial. Las combinaciones fueron:

- 1) *Salmonella* spp. inmóvil (SI) en concentración de 10^4 UFC/ml.
- 2) *Escherichia coli* (EC) en concentración de 10^4 UFC/ml.
- 3) EC en concentración de 10^7 UFC/ml.
- 4) SI + EC en concentraciones de 10^4 UFC/ml cada una (Relación 1:1).
- 5) SI + EC en concentraciones de 10^4 y 10^7 UFC/ml, respectivamente (Relación 1:1000).

Las SI se ensayaron por separado y fueron una del biovar Gallinarum y una del biovar Pullorum. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, a su vez para cada conjunto de prueba se realizaron en paralelo controles negativos, 3 muestras sin inocular la cepa en estudio.

2.2.5. Estudio de la competencia bacteriana entre *Salmonella* spp. inmóviles y *E. coli* inoculadas en guano estéril

Se realizaron recuentos de las cepas en los caldos en las diferentes etapas de las técnicas y se procedió al aislamiento de las cepas como se describió para el caso de recuperación de las cepas de *Salmonella* spp. en el guano inoculado (punto 2.1.5.). Los recuentos fueron realizados por la técnica de la gota según Miles *et al.*, (1938). De esta forma, las diferentes combinaciones se preenriquecieron en 225 ml de APB (Merck) y se la incubó a 35 ± 2 °C durante 4-6 h. Luego de transcurrido dicho tiempo se realizó el recuento en los agares ATS Y MC. A su vez, por un lado se transfirió 1 ml del cultivo a 10 ml de caldo tetratonato (Acumedia-Neogen) adicionado con 20 ml/l de solución iodo-ioduro de potasio (6 g de iodo; 5 g de ioduro de potasio; 20 ml de agua desmineralizada), solución verde brillante (0,1 %, Sigma) y 40 mg/ml de novobiocina (Sigma). El cultivo se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. (TT). Por otro lado, se transfirió 1 ml del caldo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo tetratonato base, Hajna (Acumedia), suplementado con 40 ml/l de solución de yoduro de potasio yodado (8 g de yodo, 5 g de yoduro de potasio, 40 ml de agua desmineralizada) y 40 mg /ml de novobiocina (Sigma) y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 18-24 h (TTH). A su vez, se inocularon 3 alícuotas de 30 μ l del cultivo preenriquecido en medio MSRV (Acumedia-Neogen) suplementado con 1 ml por litro de una solución de novobiocina (Sigma) al 2 %. Las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1$ °C durante 18-24 h (MSRV). En caso de los caldos tetratonatos se realizaron los recuentos en ATS y MC luego de haber transcurrido el tiempo de incubación.

Posteriormente, se realizó la inoculación en los medios sólidos selectivos-diferenciales, en los casos que se repicara desde el caldo se tomó una ansada del mismo y se realizó la inoculación por agotamiento en agar HE (Acumedia-Neogen), agar SS (Merck) y agar SB (Acumedia-Neogen), mientras que para el caso que se repicó a partir de MSRV se tomó desde el centro de la alícuota sembrada y, de existir, de la zona turbia

que se extiende desde la gota inoculada (periferia) inoculándose en los mismos medios sólidos selectivos diferenciales. En todos los casos, se las incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Paralelamente, se enriquecieron las muestras con las diferentes combinaciones, con 225 ml de caldo tetraciónato (Acumedia-Neogen) adicionado con 20 ml/l de solución iodo-ioduro de potasio (6 g de iodo; 5 g de ioduro de potasio; 20 ml de agua desmineralizada), solución verde brillante (0,1 %, Sigma) y 40 mg/ml de novobiocina (Sigma). El cultivo se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h (TTD). Transcurrido el tiempo se realizó el recuento como se detalló anteriormente, y, a su vez se sembraron en los mismos medios selectivos diferenciales para realizar el aislamiento de las bacterias inoculadas (**Figura 4**).

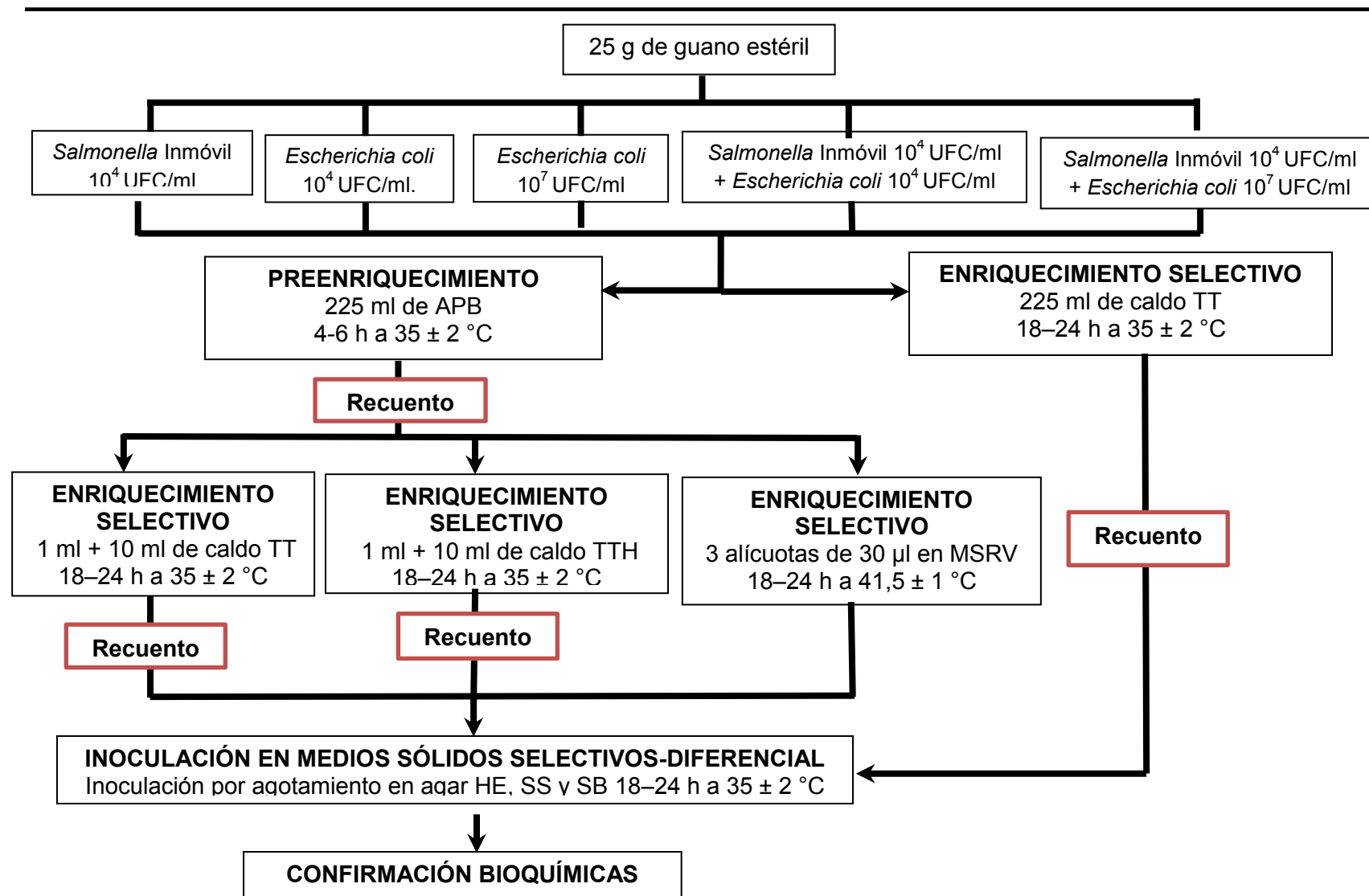


Figura 4. Diagrama de flujo para realizar el estudio de la competencia de *Salmonella* spp. inmóvil y una cepa de *E. coli* en guano estéril por 4 técnicas de aislamiento diferentes

APB= agua de peptona bufferada; MSRV= medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado; TT= caldo tetratonato; TTH= Caldo tetratonato Hajna; SS= agar *Salmonella Shigella*; HE= agar entérico Hektoen; SB= agar sulfito de bismuto.

3. RESULTADOS

3.1. GUANO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON *SALMONELLA* SPP.

3.1.1. Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación

Los recuentos de aerobios mesófilos totales, enterobacterias y hongos realizados en las 8 muestras de guano ensayadas se muestran en la **Tabla 8**. Dichas muestras tenían entre de $8,8 \times 10^8$ a $9,0 \times 10^{10}$ UFC/g aerobios mesófilos totales, $2,1 \times 10^6$ a $8,9 \times 10^8$ UFC/g enterobacterias y $3,6 \times 10^3$ a $3,5 \times 10^6$ UFC/ g hongos.

Tabla 8. Recuentos de bacterias totales, enterobacterias y hongos realizados en las 8 muestras de guano ensayadas

Guano	Aerobios mesófilos totales (UFC/g)	Enterobacterias (UFC/g)	Hongos (UFC/g)
1	$1,0 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$3,6 \times 10^3$
2	$1,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$
3	$8,8 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$
4	$9,0 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^8$	$8,9 \times 10^5$
5	$9,0 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^8$	$8,9 \times 10^5$
6	$8,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$8,9 \times 10^3$
7	$3,0 \times 10^9$	$7,8 \times 10^7$	$4,3 \times 10^4$
8	$6,0 \times 10^{10}$	$8,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$
Promedio	$4,3 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^8$	$9,7 \times 10^5$

3.1.2. Determinación de las bacterias dañadas

El daño natural de las bacterias encontrado mediante el recuento en placas en ATS y MC estuvieron entre 8,26 % y 11,54 %. Sin embargo, el recuento de *Salmonella* spp. (log UFC / ml) en ATS y MC no fue significativamente diferente para todas las cepas utilizadas (**Tabla 9**).

3.1.3. Límite de detección de las técnicas utilizadas para la recuperación de *Salmonella* spp.

El límite de detección de los diferentes métodos en las diferentes cepas de *Salmonella* spp. estudiadas se muestra en las **Tabla 10** y **Tabla 11**. En lo que respecta a las cepas de *Salmonella* spp. móvil se encontró que se recuperaron en las diluciones más bajas para la técnica de MSRV ($2,2 \times 10^2$ UFC/ 25 g), mientras que las técnicas que usaron tetrationato mostraron valores variables en cuanto al límite de detección debido a que cada cepa mostró valores diferentes, encontrándose valores de entre $7,8 \times 10^2$ y $2,7 \times 10^4$, $2,2 \times 10^4$ y $1,0 \times 10^6$ y $2,2 \times 10^2$ y $1,0 \times 10^4$ UFC/ 25 g para las técnicas de TT, TTH

y TTD, respectivamente. Para el caso de *Salmonella* spp. inmóvil, se necesitó $1,3 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^9$ UFC/25 g para recuperarlas en la técnica de MSRV y de entre $1,1 \times 10^9$ a $1,3 \times 10^9$ UFC/25 g para recuperarlas en las técnicas que utilizaron el caldo tetratonato.

Tabla 9. Porcentaje del daño natural de cada cepa de *Salmonella* spp. Los valores representan el promedio $\pm$ desvío estándar

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	log UFC/ml		% bacterias injuriadas
	Agar tripteína de soja	Agar MacConkey	
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	8,01 $\pm$ 0,03 ^a	7,97 $\pm$ 0,05 ^a	8,82
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	9,34 $\pm$ 0,02 ^a	9,30 $\pm$ 0,02 ^a	8,26
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 13311	9,89 $\pm$ 0,03 ^a	9,84 $\pm$ 0,04 ^a	11,54
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	9,43 $\pm$ 0,06 ^a	9,38 $\pm$ 0,06 ^a	11,11
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	10,1 $\pm$ 0,04 ^a	9,99 $\pm$ 0,06 ^a	8,41
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	9,11 $\pm$ 0,08 ^a	9,06 $\pm$ 0,05 ^a	10,2
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	10,1 $\pm$ 0,04 ^a	10,1 $\pm$ 0,03 ^a	9,45
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	10,1 $\pm$ 0,06 ^a	10,1 $\pm$ 0,05 ^a	9,92

^a Los valores seguidos por letras minúsculas iguales en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 10. Resultados obtenidos al inocular las cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) en guano de aves y posterior aislamiento mediante los métodos medio semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV), caldo tetratonato (TTD y TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH)

Cepas de <i>Salmonella</i> spp.	Rango de inoculación (UFC/25g)	Nº de muestras positivas/Nº total de muestras según la metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp.			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	$1,0 \times 10^8$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1,0 \times 10^7$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1,0 \times 10^6$	3/3	2/3	2/3	3/3
	$1,0 \times 10^5$	3/3	3/3	0/3	2/3
	$1,0 \times 10^4$	3/3	2/3	0/3	1/3
	$1,0 \times 10^3$	3/3	0/3	0/3	0/3
	$1,0 \times 10^2$	3/3	0/3	0/3	0/3
	$1,0 \times 10^1$	1/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	$2,2 \times 10^7$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$2,2 \times 10^6$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$2,2 \times 10^5$	3/3	2/3	2/3	3/3
	$2,2 \times 10^4$	3/3	1/3	1/3	2/3
	$2,2 \times 10^3$	3/3	0/3	0/3	2/3
	$2,2 \times 10^2$	3/3	0/3	0/3	1/3
	$2,2 \times 10^1$	2/3	0/3	0/3	0/3
	$2,2 \times 10^0$	1/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 13311	$7,8 \times 10^7$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$7,8 \times 10^6$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$7,8 \times 10^5$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$7,8 \times 10^4$	3/3	3/3	1/3	2/3
	$7,8 \times 10^3$	3/3	2/3	0/3	1/3
	$7,8 \times 10^2$	3/3	1/3	0/3	0/3
	$7,8 \times 10^1$	2/3	0/3	0/3	0/3
	$7,8 \times 10^0$	1/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	$2,7 \times 10^7$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$2,7 \times 10^6$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$2,7 \times 10^5$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$2,7 \times 10^4$	3/3	2/3	0/3	2/3
	$2,7 \times 10^3$	3/3	0/3	0/3	2/3
	$2,7 \times 10^2$	1/3	0/3	0/3	0/3
	$2,7 \times 10^1$	1/3	0/3	0/3	0/3
	$2,7 \times 10^0$	0/3	0/3	0/3	0/3

Tabla 11. Resultados obtenidos al inocular las cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) y *S. ser. Gallinarum* biovar Pullorum (SP) en guano de aves y posterior aislamiento mediante los métodos medio semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV), caldo tetratonato (TTD y TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH)

Cepas de <i>Salmonella</i> spp.	Rango de inoculación (UFC/25g)	Nº de muestras positivas/Nº total de muestras según la metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp.			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	$1,1 \times 10^{10}$	3/3	2/3	2/3	2/3
	$1,1 \times 10^9$	2/3	0/3	1/3	0/3
	$1,1 \times 10^8$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,1 \times 10^7$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,1 \times 10^6$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,1 \times 10^5$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,1 \times 10^4$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,1 \times 10^3$	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	$1,3 \times 10^9$	2/3	2/3	2/3	1/3
	$1,3 \times 10^8$	2/3	0/3	0/3	1/3
	$1,3 \times 10^7$	1/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^6$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^5$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^4$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^3$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^2$	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	$1,3 \times 10^{10}$	2/3	1/3	1/3	2/3
	$1,3 \times 10^9$	2/3	0/3	1/3	2/3
	$1,3 \times 10^8$	1/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^7$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^6$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^5$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^4$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^3$	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	$1,3 \times 10^{10}$	3/3	2/3	1/3	2/3
	$1,3 \times 10^9$	2/3	1/3	1/3	1/3
	$1,3 \times 10^8$	3/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^7$	1/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^6$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^5$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^4$	0/3	0/3	0/3	0/3
	$1,3 \times 10^3$	0/3	0/3	0/3	0/3

3.1.4. Criterios de capacidad discriminatoria de las técnicas utilizadas para la recuperación de *Salmonella* spp.

En relación al rendimiento de los métodos y considerando el estudio por separado entre cepas móviles e inmóviles, para el caso de las cepas de *Salmonella* spp. móvil el método MSRV mostró valores superiores para SE, EXA y VPN (**Tabla 12**), encontrándose diferencia significativa a favor de este método para el caso de las dos cepas de *Salmonella* del serotipo Enteritidis para SE y EXA con valores de 0,92 y 0,88 y de 0,93 y 0,89 para SE y EXA, respectivamente. En cuanto a las tres técnicas que utilizan el tetracionato, se encontró que no hubo diferencia significativa entre las mismas con valores que estuvieron entre 0,33 y 0,63 para SE y EXA. Mientras que para el caso de las dos cepas del serotipo Typhimurium se encontró que no hubo diferencias significativas entre MSRV y TT, pero si con TTH y TTD. A su vez comparando las técnicas que utilizaron el tetracionato, no se encontraron diferencias significativas entre sí. Por otro lado, si bien los valores obtenidos para VPN del método MSRV fue, al menos, el doble respecto a los otros métodos, no se encontró diferencias significativas entre los métodos en los serotipos de *Salmonella* spp. móviles ensayadas.

Por su parte, los valores de SE, EXA y VPN estuvieron entre 0,04 a 0,38; 0,15 a 0,44 y 0,12 a 0,17, respectivamente, para *Salmonella* spp. inmóviles (**Tabla 13**). En el caso de tres cepas, de las cuales dos eran del biotipo Gallinarum y una del biotipo Pullorum; individualmente, no hubo diferencias significativas en los parámetros estudiados para las 4 técnicas de aislamiento ensayadas, aunque la técnica MSRV mostró valores promedios superiores en los parámetros estudiados. Mientras que en la cepa del biovar Pullorum restante (ATCC 13036) se encontró que la técnica MSRV mostró valores estadísticamente superiores a las técnicas TTH y TTD en los parámetros de SE y EXA, respectivamente. A su vez, no se encontró diferencia significativa entre las técnicas de TT, TTH y TTD. Tomando a todas las cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum en su conjunto, la técnica de MSRV fue la que consiguió valores más altos de SE y EXA. Del mismo modo, considerando a todas las cepas inmóviles en su conjunto, la técnica de MSRV mostró estadísticamente los parámetros más altos. Por otro lado, la ESP y el VPP fue 1 para todas las cepas estudiadas en las 4 técnicas de aislamiento ensayadas.

3.1.5. Concordancia de las técnicas utilizadas para la recuperación de *Salmonella* spp.

En el análisis de los datos, utilizando los coeficientes *kappa* se observó que la concordancia fue variable entre los métodos (**Tabla 14** y **Tabla 15**). Para las cepas móviles, la concordancia estuvo entre ligera a buena, mientras que este parámetro estuvo entre débil y muy buena para cepas inmóviles. La concordancia entre MSRV y los otros métodos estuvo entre ligera a débil o débil para las cepas móviles e inmóviles, respectivamente, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos. La concordancia entre las diferentes técnicas que utilizan el tetracionato fue de buena a

excelente para las cepas móviles e inmóviles y, en general, no hubo diferencias significativas entre las mismas.

Tabla 12. Sensibilidad (SE), exactitud (EXA) y valor predictivo negativo (VPN) de las técnicas medio semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV), caldo tetratiónato (TTD y TT) y caldo tetratiónato Hajna (TTH) para los serotipos móviles de *Salmonella* spp. en muestras de guano de aves de postura contaminadas artificialmente. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Parámetro	Metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	SE	0,92 ^a (0,74-0,97)	0,54 ^b (0,35-0,72)	0,33 ^b (0,18-0,54)	0,50 ^b (0,31-0,69)
	EXA	0,93 ^a (0,76-0,98)	0,59 ^b (0,41-0,76)	0,41 ^b (0,24-0,59)	0,56 ^b (0,37-0,72)
	VPN	0,60 ^a (0,22-0,88)	0,21 ^a (0,08-0,48)	0,16 ^a (0,06-0,38)	0,20 ^a (0,07-0,46)
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	SE	0,88 ^a (0,68- 0,95)	0,38 ^b (0,21-0,57)	0,38 ^b (0,21-0,57)	0,58 ^b (0,39-0,76)
	EXA	0,89 ^a (0,72-0,96)	0,44 ^b (0,28-0,63)	0,44 ^b (0,28-0,63)	0,63 ^b (0,44-0,78)
	VPN	0,50 ^a (0,18-0,82)	0,17 ^a (0,06-0,40)	0,17 ^a (0,06-0,40)	0,23 ^a (0,08-0,51)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATTC 13311	SE	0,88 ^a (0,68- 0,95)	0,63 ^{a,c} (0,43-0,79)	0,42 ^{b,c} (0,24-0,61)	0,50 ^{b,c} (0,31-0,69)
	EXA	0,89 ^a (0,72-0,96)	0,67 ^{a,c} (0,48-0,81)	0,48 ^{b,c} (0,31-0,66)	0,56 ^{b,c} (0,37-0,72)
	VPN	0,50 ^a (0,18-0,82)	0,25 ^a (0,09-0,54)	0,18 ^a (0,06-0,41)	0,20 ^a (0,07-0,46)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	SE	0,71 ^a (0,51-0,85)	0,46 ^{a,c} (0,28-0,65)	0,38 ^{b,c} (0,21-0,57)	0,54 ^{a,c} (0,35-0,72)
	EXA	0,74 ^a (0,55-0,87)	0,52 ^{a,c} (0,34-0,69)	0,44 ^{b,c} (0,28-0,63)	0,59 ^{a,c} (0,41-0,76)
	VPN	0,30 ^a (0,11-0,61)	0,19 ^a (0,07-0,23)	0,17 ^a (0,06-0,40)	0,21 ^a (0,08-0,48)
Total <i>Salmonella</i> spp. móvil	SE	0,84 ^a (0,76-0,90)	0,50 ^b (0,40-0,60)	0,38 ^{b,c} (0,28-0,48)	0,53 ^b (0,43-0,63)
	EXA	0,86 ^a (0,78-0,91)	0,56 ^{b,c,d} (0,46-0,65)	0,44 ^{b,d} (0,35-0,54)	0,58 ^b (0,49-0,69)
	VPN	0,44 ^a (0,28-0,63)	0,20 ^b (0,12-0,32)	0,17 ^b (0,10-0,27)	0,21 ^b (0,13-0,33)

^{a,b,c,d} Los valores seguidos por letras minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 13. Sensibilidad (SE), exactitud (EXA) y valor predictivo negativo (VPN) de las técnicas medio semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV), caldo tetratonato (TTD y TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) para los serotipos inmóviles de *Salmonella* spp. en muestras de guano de aves de postura contaminadas artificialmente. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Parámetro	Metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	SE	0,21 ^a (0,09-0,41)	0,08 ^a (0,03-0,26)	0,13 ^a (0,05-0,31)	0,08 ^a (0,03-0,26)
	EXA	0,30 ^a (0,16-0,49)	0,19 ^a (0,08-0,37)	0,22 ^a (0,11-0,41)	0,19 ^a (0,08-0,37)
	VPN	0,14 ^a (0,05-0,34)	0,12 ^a (0,04-0,30)	0,13 ^a (0,05-0,31)	0,12 ^a (0,04-0,30)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	SE	0,21 ^a (0,09-0,41)	0,08 ^a (0,03-0,26)	0,08 ^a (0,03-0,26)	0,08 ^a (0,03-0,26)
	EXA	0,30 ^a (0,16-0,49)	0,19 ^a (0,08-0,37)	0,19 ^a (0,08-0,37)	0,19 ^a (0,08-0,37)
	VPN	0,14 ^a (0,05-0,34)	0,12 ^a (0,04-0,30)	0,12 ^a (0,04-0,30)	0,12 ^a (0,04-0,30)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	SE	0,21 ^a (0,09-0,41)	0,04 ^a (0,01-0,20)	0,08 ^a (0,03-0,26)	0,08 ^a (0,03-0,26)
	EXA	0,30 ^a (0,16-0,49)	0,15 ^a (0,06-0,33)	0,19 ^a (0,08-0,37)	0,19 ^a (0,08-0,37)
	VPN	0,14 ^a (0,05-0,34)	0,12 ^a (0,04-0,29)	0,12 ^a (0,04-0,30)	0,12 ^a (0,04-0,30)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	SE	0,38 ^a (0,21-0,57)	0,13 ^{a,c} (0,05-0,31)	0,08 ^{b,c} (0,03-0,26)	0,13 ^{a,c} (0,05-0,31)
	EXA	0,44 ^a (0,28-0,63)	0,22 ^{a,c} (0,11-0,41)	0,22 ^{a,c} (0,11-0,41)	0,19 ^{b,c} (0,08-0,37)
	VPN	0,17 ^a (0,06-0,40)	0,13 ^a (0,05-0,31)	0,12 ^a (0,04-0,30)	0,13 ^a (0,05-0,31)
Total <i>Salmonella</i> spp. inmóvil	SE	0,25 ^a (0,17-0,35)	0,08 ^b (0,04-0,16)	0,09 ^b (0,05-0,17)	0,09 ^b (0,05-0,17)
	EXA	0,33 ^a (0,25-0,43)	0,19 ^b (0,12-0,27)	0,19 ^b (0,13-0,28)	0,19 ^b (0,13-0,28)
	VPN	0,14 ^a (0,08-0,23)	0,12 ^a (0,07-0,20)	0,12 ^a (0,07-0,20)	0,12 ^a (0,07-0,20)

^{a,b,c} Los valores seguidos por letras minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 14. Concordancia (coeficiente Kappa y test de McNemar) entre las diferentes técnicas de cultivo para muestras de guano contaminadas artificialmente con *Salmonella* spp. móvil.

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Comparación entre las técnicas	Concordancia entre las técnicas	
		Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	MSRV/TT	0,35	0,0077
	MSRV/TTH	0,17	0,0005
	MSRV/TTD	0,31	0,0044
	TT/TTH	0,62	0,0736
	TT/TTD	0,78	1,0000
	TTH/TTD	0,69	0,1336
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	MSRV/TT	0,25	0,0015
	MSRV/TTH	0,25	0,0015
	MSRV/TTD	0,47	0,0233
	TT/TTH	1,00	- ³
	TT/TTD	0,63	0,0736
	TTH/TTD	0,63	0,0736
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATTC 13311	MSRV/TT	0,53	0,0412
	MSRV/TTH	0,29	0,0026
	MSRV/TTD	0,37	0,0077
	TT/TTH	0,64	0,0736
	TT/TTD	0,78	0,2482
	TTH/TTD	0,85	0,4795
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	MSRV/TT	0,58	0,0412
	MSRV/TTH	0,45	0,0133
	MSRV/TTD	0,71	0,1336
	TT/TTH	0,84	0,4795
	TT/TTD	0,85	0,4795
	TTH/TTD	0,70	0,1336
Total <i>Salmonella</i> spp. móvil	MSRV/TT	0,42	0,0001
	MSRV/TTH	0,29	0,0001
	MSRV/TTD	0,46	0,0001
	TT/TTH	0,77	0,0015
	TT/TTD	0,76	0,5791
	TTH/TTD	0,72	0,0003

¹Indica que kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

²Determinado con la prueba de chi-cuadrado de McNemar para muestras pareadas.

³No se puede realizar la prueba de McNemar's debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

Tabla 15. Concordancia (coeficiente Kappa y test McNemar) entre las diferentes técnicas de cultivo para muestras de guano contaminadas artificialmente con *Salmonella* spp. inmóvil.

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Comparación entre las técnicas	Concordancia entre las técnicas	
		Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	MSRV/TT	0,52	0,2482
	MSRV/TTH	0,71	0,4795
	MSRV/TTD	0,52	0,2482
	TT/TTH	0,78	1,0000
	TT/TTD	1,00	_ ³
	TTH/TTD	0,78	1,0000
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	MSRV/TT	0,52	0,2482
	MSRV/TTH	0,52	0,2482
	MSRV/TTD	0,52	0,2482
	TT/TTH	1,00	_ ³
	TT/TTD	0,46	0,4795
	TTH/TTD	0,46	0,4795
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	MSRV/TT	0,29	0,1336
	MSRV/TTH	0,52	0,2482
	MSRV/TTD	0,52	0,2482
	TT/TTH	0,65	1,0000
	TT/TTD	0,65	1,0000
	TTH/TTD	1,00	_ ³
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	MSRV/TT	0,40	0,0412
	MSRV/TTH	0,28	0,0233
	MSRV/TTD	0,40	0,0412
	TT/TTH	0,78	1,0000
	TT/TTD	1,00	_ ³
	TTH/TTD	0,78	1,0000
Total <i>Salmonella</i> spp. inmóvil	MSRV/TT	0,44	0,0002
	MSRV/TTH	0,48	0,0003
	MSRV/TTD	0,48	0,0003
	TT/TTH	0,81	1,0000
	TT/TTD	0,81	1,0000
	TTH/TTD	0,76	0,6171

¹Indica que kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

²Determinado con la prueba de chi-cuadrado de McNemar para muestras pareadas.

³No se pudo realizar la prueba de McNemar's debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

3.1.6. Criterios de capacidad discriminatoria de los medios utilizados para la recuperación de *Salmonella* spp.

En relación al rendimiento de los medios de cultivos selectivos-diferenciales, considerando las cepas de *Salmonella* spp. móvil, los medios de cultivos HE y SS se comportaron de manera similar en la mayoría de los casos en lo que respecta a SE, EXA y VPN, y solo se observó diferencias significativas entre los medios de cultivos en la técnica de TTH para el parámetro de SE. Sin embargo hubo diferencias significativas entre los métodos de aislamiento para los mismos medios de cultivos selectivos-diferenciales, siendo el MSRV periferia el que presentó valores mayores (**Tabla 16, Tabla 17 y Tabla 18**). Para el caso particular de la cepa de ST CUB 59/10, cuando se realizó el ensayo no se evidenció halo blanco alrededor del punto de inoculación (periferia). Que luego al repetir el ensayo se logró evidenciar dicha periferia.

Por otro parte, las cepas de *Salmonella* spp. inmóvil mostraron la misma tendencia que las cepas móviles, debido a que los medios de cultivo H y SS mostraron valores superiores a los de SB. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre estos dos medios de cultivo en ninguna de las técnicas ensayadas. A su vez, hubo diferencias significativas entre los métodos de aislamiento para los mismos medios de cultivos selectivos diferenciales, siendo el MSRV el que presentó valores mayores para los parámetros de SE y EXA, mientras que no hubo diferencias significativas para los diferentes medios para el caso de VPN (**Tabla 19, Tabla 20 y Tabla 21**).

Tabla 16. Sensibilidad (SE) de los medios de cultivo agarizados selectivos diferenciales en los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), caldo tetratonato (TTD, TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) para las cepas de *Salmonella* spp. móvil inoculadas

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Medios de cultivo	SE según metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano				
		MSRV Centro	MSRV Periferia	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	HE	0,88 ^{A a} (0,71-0,97)	0,92 ^{A a} (0,76-0,99)	0,54 ^{A b} (0,35-0,72)	0,33 ^{A b} (0,17-0,53)	0,42 ^{A b} (0,24-0,61)
	SS	0,83 ^{A a} (0,66-0,94)	0,92 ^{A a} (0,76-0,99)	0,42 ^{A b} (0,24-0,61)	0,29 ^{A b} (0,14-0,48)	0,38 ^{A b} (0,21-0,57)
	SB	0,83 ^{A a} (0,66-0,94)	0,88 ^{A a} (0,71-0,97)	0,38 ^{A b} (0,21-0,57)	0,17 ^{A b} (0,06-0,34)	0,38 ^{A b} (0,21-0,57)
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	HE	0,25 ^{A c} (0,11-0,44)	0,88 ^{A a} (0,71-0,97)	0,29 ^{A c} (0,14-0,48)	0,33 ^{A b,c} (0,17-0,53)	0,58 ^{A b} (0,38-0,76)
	SS	0,25 ^{A b,c} (0,11-0,44)	0,83 ^{A a} (0,66-0,94)	0,33 ^{A b,c} (0,17-0,53)	0,21 ^{A c} (0,08-0,39)	0,50 ^{A b} (0,31-0,69)
	SB	0,08 ^{A c} (0,01-0,24)	0,71 ^{A a} (0,52-0,86)	0,29 ^{A b,c} (0,14-0,48)	0,17 ^{A b,c} (0,06-0,34)	0,33 ^{A b} (0,17-0,53)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 13311	HE	0,83 ^{A a} (0,66-0,94)	0,83 ^{A a} (0,66-0,94)	0,58 ^{A a,c} (0,38-0,76)	0,38 ^{A b,c} (0,21-0,57)	0,42 ^{A b,c} (0,24-0,61)
	SS	0,83 ^{A a} (0,66-0,94)	0,88 ^{A a} (0,71-0,97)	0,54 ^{A b} (0,35-0,72)	0,38 ^{A b} (0,21-0,57)	0,42 ^{A b} (0,24-0,61)
	SB	0,79 ^{A a} (0,61-0,92)	0,79 ^{A a} (0,61-0,92)	0,46 ^{A b} (0,28-0,65)	0,21 ^{A b} (0,08-0,39)	0,42 ^{A b} (0,24-0,61)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	HE	0,58 ^{A a} (0,38-0,76)	SD ¹	0,38 ^{A a} (0,21-0,57)	0,33 ^{A a} (0,17-0,53)	0,54 ^{A a} (0,35-0,72)
	SS	0,46 ^{A b,a} (0,28-0,65)	SD ¹	0,38 ^{A a} (0,21-0,57)	0,33 ^{A a} (0,17-0,53)	0,50 ^{A a} (0,31-0,69)
	SB	0,29 ^{B a} (0,14-0,48)	SD ¹	0,13 ^{A a} (0,03-0,29)	0,29 ^{A a} (0,14-0,48)	0,38 ^{A a} (0,21-0,57)
Total <i>Salmonella</i> spp. móvil	HE	0,63 ^{A a} (0,54-0,72)	0,88 ^{A b} (0,79-0,94)	0,45 ^{A c,d} (0,35-0,55)	0,34 ^{A c,d} (0,26-0,44)	0,49 ^{A c} (0,39-0,59)
	SS	0,59 ^{A a} (0,49-0,69)	0,88 ^{A b} (0,79-0,94)	0,42 ^{A c,d} (0,32-0,52)	0,30 ^{B d} (0,22-0,40)	0,45 ^{A c} (0,35-0,55)
	SB	0,50 ^{A a} (0,40-0,60)	0,80 ^{A b} (0,70-0,87)	0,31 ^{A c,d} (0,23-0,41)	0,21 ^{B d} (0,14-0,30)	0,38 ^{A a,c} (0,28-0,48)

¹ SD: sin datos. No hubo periferia

a,b,c,d Los valores seguidos por diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

^{A,B} Los valores seguidos por diferentes letras mayúsculas en la misma columna para cada cepa son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto.

Tabla 17. Exactitud (EXA) de los medios de cultivo agarizados selectivos diferenciales en los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), caldo tetratonato (TTD, TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) para las cepas de *Salmonella* spp. móvil inoculadas

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Medios de cultivo	EXA según metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano				
		MSRV Centro	MSRV Periferia	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	HE	0,89 ^{Aa} (0,74-0,97)	0,93 ^{Aa} (0,79-0,99)	0,59 ^{Ab} (0,41-0,76)	0,41 ^{Ab} (0,24-0,59)	0,48 ^{Ab} (0,31-0,66)
	SS	0,85 ^{Aa} (0,69-0,95)	0,93 ^{Aa} (0,79-0,99)	0,48 ^{Ab} (0,31-0,66)	0,37 ^{Ab} (0,21-0,55)	0,44 ^{Ab} (0,27-0,63)
	SB	0,85 ^{Aa} (0,69-0,95)	0,93 ^{Aa} (0,79-0,99)	0,44 ^{Ab} (0,27-0,63)	0,26 ^{Ab} (0,12-0,44)	0,44 ^{Ab} (0,27-0,63)
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	HE	0,33 ^{Ac} (0,18-0,52)	0,89 ^{Aa} (0,74-0,97)	0,37 ^{Ab,c} (0,21-0,55)	0,41 ^{Ab,c} (0,24-0,59)	0,63 ^{Ab} (0,45-0,79)
	SS	0,33 ^{Ab} (0,18-0,52)	0,85 ^{Aa} (0,69-0,95)	0,41 ^{Ab} (0,24-0,59)	0,30 ^{Ab} (0,15-0,48)	0,56 ^{Ab} (0,37-0,73)
	SB	0,19 ^{Ab} (0,07-0,35)	0,74 ^{Aa} (0,56-0,88)	0,37 ^{Ab} (0,21-0,55)	0,26 ^{Ab} (0,12-0,44)	0,41 ^{Ab} (0,24-0,59)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 13311	HE	0,85 ^{Aa} (0,69-0,95)	0,85 ^{Aa} (0,69-0,95)	0,63 ^{Aa,b} (0,45-0,79)	0,44 ^{Ab} (0,27-0,63)	0,48 ^{Ab} (0,31-0,66)
	SS	0,85 ^{Aa} (0,69-0,95)	0,89 ^{Aa} (0,74-0,97)	0,59 ^{Ab} (0,41-0,76)	0,44 ^{Ab} (0,27-0,63)	0,48 ^{Ab} (0,31-0,66)
	SB	0,82 ^{Aa} (0,65-0,93)	0,82 ^{Aa} (0,65-0,93)	0,52 ^{Ab} (0,34-0,69)	0,30 ^{Ab} (0,15-0,48)	0,48 ^{Ab} (0,31-0,66)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	HE	0,63 ^{Aa} (0,45-0,79)	SD ¹	0,44 ^{Aa} (0,27-0,63)	0,41 ^{Aa} (0,24-0,59)	0,59 ^{Aa} (0,41-0,76)
	SS	0,52 ^{Aa} (0,34-0,69)	SD ¹	0,44 ^{Aa} (0,27-0,63)	0,41 ^{Aa} (0,24-0,59)	0,56 ^{Aa} (0,37-0,73)
	SB	0,37 ^{Aa} (0,21-0,55)	SD ¹	0,22 ^{Aa} (0,10-0,40)	0,37 ^{Aa} (0,21-0,55)	0,44 ^{Aa} (0,27-0,63)
Total <i>Salmonella</i> spp. móvil	HE	0,68 ^{Aa} (0,58-0,76)	0,90 ^{Ab} (0,81-0,94)	0,51 ^{Ac} (0,42-0,60)	0,42 ^{Ac} (0,33-0,51)	0,55 ^{Aa,c} (0,45-0,64)
	SS	0,64 ^{Aa} (0,54-0,72)	0,90 ^{Ab} (0,81-0,94)	0,48 ^{Ac} (0,39-0,47)	0,38 ^{Ac} (0,29-0,47)	0,51 ^{Aa,c} (0,42-0,60)
	SB	0,56 ^{Aa} (0,46-0,65)	0,83 ^{Ab} (0,73-0,89)	0,39 ^{Ac,d} (0,30-0,48)	0,30 ^{Ad} (0,22-0,39)	0,44 ^{Aa,c} (0,35-0,54)

¹ SD: sin datos. No hubo periferia

a,b,c,d Los valores seguidos por diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada parámetro son significativamente diferentes (p < 0,05).

A,B Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes (p < 0,05).

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto.

Tabla 18. Valor predictivo negativo (VPN) de los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales en los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), caldo tetratonato (TTD, TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) para las cepas de *Salmonella* spp. móvil inoculadas

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Medios de cultivo	VPN según metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano				
		MSRV Centro	MSRV Periferia	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	HE	0,50 ^{A a} (0,18-0,82)	0,60 ^{A a} (0,24-0,90)	0,21 ^{A a} (0,06-0,46)	0,16 ^{A a} (0,04-0,36)	0,18 ^{A a} (0,05-0,39)
	SS	0,43 ^{A a} (0,15-0,75)	0,60 ^{A a} (0,24-0,90)	0,18 ^{A a} (0,05-0,39)	0,15 ^{A a} (0,04-0,34)	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)
	SB	0,43 ^{A a} (0,15-0,75)	0,50 ^{A a} (0,18-0,82)	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)	0,13 ^{A a} (0,03-0,30)	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	HE	0,14 ^{A a} (0,04-0,33)	0,50 ^{A a} (0,18-0,82)	0,15 ^{A a} (0,04-0,34)	0,16 ^{A a} (0,04-0,36)	0,23 ^{A a} (0,07-0,48)
	SS	0,14 ^{A a} (0,04-0,33)	0,43 ^{A a} (0,15-0,75)	0,16 ^{A a} (0,04-0,36)	0,14 ^{A a} (0,04-0,33)	0,20 ^{A a} (0,06-0,43)
	SB	0,13 ^{A a} (0,03-0,29)	0,30 ^{A a} (0,09-0,59)	0,15 ^{A a} (0,04-0,34)	0,13 ^{A a} (0,03-0,30)	0,16 ^{A a} (0,04-0,36)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 13311	HE	0,43 ^{A a} (0,15-0,75)	0,43 ^{A a} (0,15-0,75)	0,23 ^{A a} (0,07-0,48)	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)	0,18 ^{A a} (0,05-0,39)
	SS	0,43 ^{A a} (0,15-0,75)	0,50 ^{A a} (0,18-0,82)	0,21 ^{A a} (0,06-0,46)	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)	0,18 ^{A a} (0,05-0,39)
	SB	0,38 ^{A a} (0,12-0,69)	0,38 ^{A a} (0,12-0,69)	0,15 ^{A a} (0,04-0,34)	0,14 ^{A a} (0,04-0,33)	0,18 ^{A a} (0,05-0,39)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	HE	0,23 ^{A a} (0,07-0,48)	SD ¹	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)	0,16 ^{A a} (0,04-0,36)	0,21 ^{A a} (0,06-0,46)
	SS	0,19 ^{A a} (0,05-0,41)	SD ¹	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)	0,16 ^{A a} (0,04-0,36)	0,20 ^{A a} (0,06-0,43)
	SB	0,15 ^{A a} (0,04-0,34)	SD ¹	0,13 ^{A a} (0,03-0,29)	0,15 ^{A a} (0,04-0,34)	0,17 ^{A a} (0,05-0,37)
Total <i>Salmonella</i> spp. móvil	HE	0,26 ^{A a} (0,15-0,40)	0,57 ^{A b} (0,36-0,76)	0,18 ^{A a} (0,11-0,30)	0,16 ^{A a} (0,09-0,26)	0,20 ^{A a} (0,12-0,31)
	SS	0,24 ^{A a} (0,14-0,37)	0,57 ^{A b} (0,36-0,76)	0,18 ^{A a} (0,10-0,28)	0,15 ^{A a} (0,09-0,25)	0,18 ^{A a} (0,11-0,30)
	SB	0,20 ^{A a} (0,12-0,32)	0,44 ^{A b} (0,28-0,63)	0,15 ^{A a} (0,09-0,25)	0,14 ^{A a} (0,08-0,22)	0,17 ^{A a} (0,10-0,27)

¹ SD: sin datos. No hubo periferia

^{a, b} Los valores seguidos por diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

^{A, B} Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto

Tabla 19. Sensibilidad (SE) de los medios de cultivo agarizados selectivos diferenciales en los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), caldo tetrationato (TTD, TT) y caldo tetrationato Hajna (TTH) para las cepas de *Salmonella* spp. inmóvil inoculadas

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Medios de cultivo	SE según metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	HE	0,21 ^{A a} (0,09-0,41)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)
	SS	0,21 ^{A a} (0,09-0,41)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)
	SB	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	HE	0,17 ^{A a} (0,07-0,36)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)	0,00 ^{A a} (0,01-0,20)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)
	SS	0,17 ^{A a} (0,07-0,36)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)
	SB	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	HE	0,25 ^{A a} (0,12-0,45)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)
	SS	0,17 ^{A a} (0,07-0,36)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)
	SB	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)	0,00 ^{A a} (0,00-0,14)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	HE	0,33 ^{A a} (0,18-0,54)	0,08 ^{A b} (0,03-0,26)	0,08 ^{A b} (0,03-0,26)	0,08 ^{A b} (0,03-0,26)
	SS	0,17 ^{A a} (0,07-0,36)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,04 ^{A a} (0,01-0,20)	0,08 ^{A a} (0,03-0,26)
	SB	0,21 ^{A a} (0,09-0,41)	0,00 ^{A b} (0,00-0,14)	0,04 ^{A a, b} (0,01-0,20)	0,00 ^{A b} (0,00-0,14)
Total <i>Salmonellas</i> spp. inmóvil	HE	0,24 ^{A a} (0,17-0,33)	0,07 ^{A b} (0,04-0,14)	0,07 ^{A b} (0,04-0,14)	0,06 ^{A, B b} (0,03-0,13)
	SS	0,18 ^{A, B a} (0,11-0,27)	0,04 ^{A, B b} (0,02-0,10)	0,08 ^{A, a, b} (0,04-0,16)	0,07 ^{A b} (0,04-0,14)
	SB	0,13 ^{B a} (0,07-0,21)	0,00 ^{B b} (0,00-0,04)	0,02 ^{A b} (0,01-0,07)	0,01 ^{B b} (0,00-0,06)

^{a, b} Los valores seguidos por diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

^{A, B} Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto.

Tabla 20. Exactitud (EXA) de los medios de cultivo agarizados selectivos diferenciales en los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV5), caldo tetratonato (TTD, TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) para las cepas de *Salmonella* spp. inmóvil inoculadas

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Medios de cultivo	EXA según metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	HE	0,30 ^{A a} (0,16-0,49)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)	0,22 ^{A a} (0,11-0,41)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)
	SS	0,30 ^{A a} (0,16-0,49)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,22 ^{A a} (0,11-0,41)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)
	SB	0,22 ^{A a} (0,11-0,41)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	HE	0,26 ^{A a} (0,13-0,45)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
	SS	0,26 ^{A a} (0,13-0,45)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)
	SB	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	HE	0,33 ^{A a} (0,19-0,52)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)
	SS	0,26 ^{A a} (0,13-0,45)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)
	SB	0,22 ^{A a} (0,11-0,41)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	HE	0,41 ^{A a} (0,24-0,59)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)
	SS	0,26 ^{A a} (0,13-0,45)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,19 ^{A a} (0,08-0,37)
	SB	0,30 ^{A a} (0,16-0,49)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,15 ^{A a} (0,06-0,33)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
Total <i>Salmonella</i> spp. inmóvil	HE	0,32 ^{A a} (0,24-0,42)	0,18 ^{A b} (0,12-0,26)	0,18 ^{A b} (0,12-0,26)	0,17 ^{A b} (0,11-0,25)
	SS	0,27 ^{A a} (0,19-0,36)	0,15 ^{A b} (0,09-0,23)	0,19 ^{A b} (0,12-0,27)	0,18 ^{A b} (0,12-0,26)
	SB	0,22 ^{A a} (0,15-0,31)	0,11 ^{A b} (0,07-0,18)	0,13 ^{A a,b} (0,08-0,21)	0,12 ^{A b} (0,07-0,20)

^{a, b} Los valores seguidos por diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

^{A,B} Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto.

Tabla 21. Valor predictivo negativo (VPN) de los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales en los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), caldo tetratonato (TTD, TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) para las cepas de *Salmonella* spp. inmóvil inoculadas

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Medios de cultivo	VPN según metodología para detectar <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de guano			
		MSRV	TT	TTH	TTD
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 55/10	HE	0,14 ^{A a} (0,05-0,34)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)
	SS	0,14 ^{A a} (0,05-0,34)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)
	SB	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum CUB 05/10	HE	0,13 ^{A a} (0,05-0,32)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
	SS	0,13 ^{A a} (0,05-0,32)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)
	SB	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA Balcarce 90/142	HE	0,14 ^{A a} (0,05-0,35)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)
	SS	0,13 ^{A a} (0,05-0,32)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)
	SB	0,13 ^{A a} (0,05-0,31)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum ATCC 13036	HE	0,16 ^{A a} (0,06-0,38)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)
	SS	0,13 ^{A a} (0,05-0,32)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,12 ^{A a} (0,04-0,30)
	SB	0,14 ^{A a} (0,05-0,34)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)	0,12 ^{A a} (0,04-0,29)	0,11 ^{A a} (0,04-0,28)
Total <i>Salmonella</i> spp. inmóvil	HE	0,14 ^{A a} (0,08-0,23)	0,12 ^{A a} (0,07-0,20)	0,12 ^{A a} (0,07-0,20)	0,12 ^{A a} (0,07-0,19)
	SS	0,13 ^{A a} (0,07-0,22)	0,11 ^{A a} (0,07-0,19)	0,12 ^{A a} (0,07-0,20)	0,12 ^{A a} (0,07-0,20)
	SB	0,13 ^{A a} (0,07-0,21)	0,11 ^{A a} (0,07-0,18)	0,11 ^{A a} (0,07-0,19)	0,11 ^{A a} (0,07-0,19)

^{a, b} Los valores seguidos por diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

^{A, B} Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto.

3.1.7. Concordancia de los medios utilizados para la recuperación de *Salmonella* spp.

En el análisis de los datos, utilizando los coeficientes kappa y el test de McNemar se observó que la concordancia fue variable entre los medios de cultivo selectivos diferenciales (**Tabla 22 y Tabla 23**). Para el caso de las cepas móviles, la concordancia estuvo entre buena a excelente para los casos de HE vs SS, no encontrándose diferencias significativas entre ellos, y entre buena y muy buena para HE vs SB y SS vs SB, encontrándose diferencias significativas para los casos de MSRV centro, TT, y TTH solo en HE vs SB. Por otro lado, la concordancia estuvo entre débil y buena para cepas inmóviles para el caso de HE vs SS, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Para los casos de HE vs SB y SS vs SB, las concordancias fueron variables y estuvieron entre nula y buena, y sólo la diferencia fue significativa en las técnicas de TTH y TTD, y MSRV y TT para los casos de HE vs SB y SS vs SB, respectivamente.

Tabla 22. Concordancia (coeficiente Kappa y test de McNemar) entre diferentes medios de cultivo selectivos-diferenciales en las distintas técnicas para muestras de guano contaminadas artificialmente con *Salmonella* spp. móviles.

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Técnicas	Comparación entre los medios de cultivos selectivos-diferenciales					
		HE/SS		HE/SB		SS/SB	
		Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²	Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²	Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis CUB 08/12	MSRV C	0,90	1,0000	0,90	1,0000	1,00	- ³
	MSRV P	1,00	- ³	0,89	1,0000	0,89	1,0000
	TT	0,78	0,2482	0,70	0,1336	0,76	1,0000
	TTH	0,91	1,0000	0,58	0,1336	0,66	0,2482
	TTD	0,59	1,0000	0,76	1,0000	0,83	0,4795
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	MSRV C	1,00	- ³	0,44	0,1336	0,44	0,1336
	MSRV P	0,90	1,0000	0,65	0,1336	0,75	0,2482
	TT	0,91	1,0000	0,81	0,4795	0,72	1,0000
	TTH	0,70	0,2482	0,58	0,1336	0,60	1,0000
	TTD	0,85	0,4795	0,56	0,0412	0,69	0,1336
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATTC 13311	MSRV C	1,00	- ³	0,91	1,0000	0,91	1,0000
	MSRV P	0,90	1,0000	0,91	1,0000	0,81	0,4795
	TT	0,93	1,0000	0,78	0,2482	0,85	0,4795
	TTH	0,83	0,4795	0,63	0,1336	0,63	0,1336
	TTD	0,68	0,6171	0,84	0,4795	0,84	0,4795
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium CUB 59/10	MSRV C	0,78	0,2482	0,35	0,0455	0,19	0,3428
	MSRV P	SD ⁴	SD ⁴	SD ⁴	SD ⁴	SD ⁴	SD ⁴
	TT	0,83	0,4795	0,40	0,0412	0,40	0,0412
	TTH	0,82	0,4795	0,91	1,0000	0,72	1,0000
	TTD	0,93	1,0000	0,70	0,1336	0,77	0,2482
Total <i>Salmonella</i> spp. móvil	MSRV C	0,93	0,1336	0,73	0,0019	0,72	0,0389
	MSRV P	0,94	0,4795	0,83	0,1336	0,83	0,1336
	TT	0,86	0,1306	0,69	0,0019	0,71	0,0162
	TTH	0,82	0,2888	0,68	0,0009	0,66	0,0265
	TTD	0,77	0,3865	0,71	0,0098	0,78	0,0704

¹ Indica que kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

² Determinado con la prueba de chi-cuadrado de McNemar para muestras pareadas.

³ No se pudo realizar la prueba de McNemar's debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

⁴ SD: sin datos. No hubo periferia

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto; C = centro; P = periferia.

Tabla 23. Concordancia (coeficiente Kappa y test de McNemar) entre diferentes medios de cultivo selectivos-diferenciales en las distintas técnicas para muestras de guano contaminadas artificialmente con *Salmonella* spp. (*Salmonella* ser. Gallinarum biovars Gallinarum- SG- y Pullorum -SP-)

Cepa de <i>Salmonella</i> spp.	Técnicas	Comparación entre los medios de cultivos selectivos-diferenciales					
		HE/SS		HE/SB		SS/SB	
		Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²	Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²	Coeficiente Kappa ¹	Valor p ²
SG CUB 55/10	MSRV	1,00	- ³	0,71	0,4795	0,71	0,4795
	TT	0,65	1,0000	0,00	0,4795	0,00	1,0000
	TTH	1,00	- ³	0,47	0,4795	0,47	0,4795
	TTD	0,65	1,0000	0,00	0,4795	0,00	1,0000
SG CUB 05/10	MSRV	0,71	0,4795	0,36	0,2482	0,36	0,2482
	TT	0,65	1,0000	0,00	0,4795	0,00	1,0000
	TTH	0,65	1,0000	0,00	1,0000	0,00	0,4795
	TTD	0,00	0,4795	indeterminado	- ³	0,00	0,4795
SP INTA Balcarce 90/142	MSRV	0,76	0,4795	0,61	0,2482	0,84	1,0000
	TT	1,00	- ³	0,00	1,0000	0,00	1,0000
	TTH	0,65	1,0000	0,00	1,0000	0,00	0,4795
	TTD	1,00	- ³	0,65	1,0000	0,65	1,0000
SP ATCC 13036	MSRV	0,58	0,1336	0,70	0,2482	0,87	1,0000
	TT	0,65	1,0000	0,00	0,4795	0,00	1,0000
	TTH	0,65	1,0000	0,47	0,4795	1,00	- ³
	TTD	0,46	0,4795	0,00	0,4795	0,00	0,4795
Total <i>Salmonella</i> spp. inmóvil	MSRV	0,76	0,0771	0,63	0,0026	0,72	0,1306
	TT	0,71	0,2482	0,00	0,0233	0,00	0,1336
	TTH	0,79	1,0000	0,38	0,0412	0,38	0,0412
	TTD	0,59	1,0000	0,27	0,0736	0,24	0,0412

¹ Indica que kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

² Determinado con la prueba de chi-cuadrado de McNemar para muestras pareadas.

³ No se pudo realizar la prueba de McNemar's debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

SS = agar *Salmonella-Shigella*; HE = agar entérico Hektoen; SB = agar sulfito de bismuto.

3.2. GUANO ESTERIL CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON *SALMONELLA* SPP. INVÓVIL Y *E. COLI*

3.2.1. Recuentos de *Salmonella* spp. inmóviles y *E. coli* inoculadas en guano estéril y porcentaje de cepas dañadas

Los resultados de los recuentos del ensayo de inoculación de cepas de *Salmonella* spp. inmóviles y *E. coli* (EC) se muestran en la **Tabla 24**. En cuanto a la inoculación de las cepas individualmente (control) en guano se observó que EC en concentraciones de 10^4 UFC/ml solo se logró contar en APB, mientras que la misma cepa, pero inoculada en concentraciones de 10^7 UFC/ml se logró contar en las cuatro técnicas ensayadas, siendo el recuento más elevado el de APB, seguidos por TTD, TTH y TT. SG (10^4 UFC/ml) no pudo contarse en el enriquecimiento directo con TTD, mientras que se obtuvieron valores de recuentos en las 3 técnicas restantes, siendo el mayor de ellos en las técnicas de TTH y TT. En lo que refiere a los recuentos de SP (10^4 UFC/ml), se logró contar en todos los enriquecimientos, teniendo los recuentos más elevados en los caldos que utilizan tetraciónato. En los casos que se pudo realizar el recuento de las cepas individualmente no se encontró diferencias significativas entre los agares ATS y MC. A su vez, comparando los recuentos para el mismo medio de cultivo en las diferentes técnicas se encontró que hubo recuentos superiores para APB para ambos medios en el caso de EC para la concentración de 10^7 UFC/ml. Para el medio MC se encontró diferencia estadística en el recuento entre TT y TTH. Del mismo modo, para el caso SG se encontró que para MC y ATS el recuento en APB fue menor que en TT y TTH, Para el caso de SP en MC se encontró diferencia en el recuento en todos los casos, menos para la comparación de TT y TTH; y para el medio ATS se encontró diferencia en el recuento entre el medio APB con el resto y entre los TT se encontró que no hubo diferencia entre TTD y TTH y entre TT y TTH.

En lo que respecta a la combinación de EC + SG en relación 1:1 se observó que EC sólo se pudo contar en APB, mientras que SG se pudo contar en APB, TT y TTH, siendo los recuentos más altos en este último. A su vez, para ambas cepas se encontró diferencias entre los recuentos de agar ATS y MC solamente para los recuentos realizados en APB. Cuando la inoculación de EC + SG fue en relación 1000:1 también se observó que EC se pudo contar solamente en APB, pero con valores superiores a los hallados cuando se inoculó en la relación 1:1, también con diferencia entre los recuentos en ATS y MC. Por su parte, SG sólo se pudo contar en las técnicas de enriquecimiento de TT y TTH, y sin diferencias entre los recuentos en ATS y MC.

Por último, al enfrentar EC + SP en relación 1:1 se observó que, al igual que para el caso de EC + SG en relación 1:1, solo se logró contar EC en APB. Por otro lado, SP se logró contar en todos los caldos, teniendo los recuentos más elevados en los medios con tetraciónato y sólo con diferencias significativas en los recuentos entre ATS y MC para los realizados en APB. Cuando se inocularon EC + SP en relación 1000:1 en guano se observó que EC se pudo contar solo en APB, con diferencias entre los recuentos de ATS y MC. Por su parte SP, se pudo contar en las cuatro técnicas siendo los mayores

recuentos los encontrados en TTD y TTH, seguidos por TT y APB, sin diferencia entre los recuentos en ATS y MC.

Por otro lado, realizando la comparación de las mismas cepas de igual concentración inoculadas con los diferentes tratamientos, se encontró que para el caso de los recuentos realizados en APB, las EC inoculadas en una concentración de 10^4 no mostraron diferencias entre ellas, mientras que la misma cepa en concentración de 10^7 demostró diferencias significativas entre el control y los recuentos realizados cuando se inocularon junto a las *Salmonella* spp. tipo inmóvil. A su vez, los resultados indicaron diferencias entre los recuentos realizados en los tratamientos con SG y SP. SG mostró diferencias en el recuento cuando fue coincubada con EC en relación 1/1000, con respecto al control y a la coincubación en relación 1/1, estos dos últimos no mostraron diferencias significativas entre sí. Por otro lado, el recuento de SP resultó ser diferente comparando el control con las coincubaciones en relación 1/1 y 1/1000 con EC, pero estas dos últimas no mostraron diferencias entre sí.

Para el caso de TTD solo se pudieron realizar los recuentos para la cepa de SP, encontrándose diferencias entre el control y las coincubaciones en relación 1/1 y 1/1000 con EC, pero estas dos últimas no mostraron diferencias entre sí. En los caldos TT, las EC solo pudieron contarse en la cepa control en la concentración más alta, mientras que la cepas inmóviles pudieron ser contadas en todos los casos; para SG no se encontró diferencias entre el control y los recuentos realizados en la coincubación con EC en relación 1/1 y 1/1000; mientras que SP no mostró diferencias entre el control y en la coincubación con EC en relación 1/1 y 1/1000, pero si hubo significancias entre las coincubaciones.

Por último, para los recuentos realizados en TTH, las SG mostraron diferencias de los recuentos entre el control y la coincubación con EC en relación 1/1000. Caso contrario sucedió para la coincubación en relación 1/1, donde no se halló significancia con el control, y, a su vez, hubo diferencias entre los recuentos obtenidos en las coincubaciones con EC. Para el caso del recuento de SP, no se encontró diferencia significativa entre el control y la coincubación con EC en las relaciones 1/1 y 1/1000.

Tabla 24. Recuentos de cepas inoculadas en guano estéril y porcentaje de cepas injuriadas (% CI) para agua peptona bufferada (APB), caldo tetratonato directo (TTD), caldo tetratonato luego de preenriquecimiento (TT) y caldo tetratonato según Hajna luego de preenriquecimiento (TTH) por inoculación en agar tripteína de soja (ATS) y agar MacConkey (MC). Los valores representan el promedio $\pm$ desvío estándar. Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Salmonella*. ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) CUB 55/10, *S. ser. Gallinarum* biovar Poullorum (SP) INTA Balcarce 90-142 y *E. coli* (EC). Los valores representan el promedio $\pm$ desvío estándar

Tratamiento	Bacteria	APB			TTD			TT			TTH		
		Log UFC/ml		% CI	Log UFC/ml		% CI	Log UFC/ml		% CI	Log UFC/ml		% CI
		ATS	MC		ATS	MC		ATS	MC		ATS	MC	
10⁴ EC	EC	4,50 $\pm$ 0,20 ^a	4,00 $\pm$ 0,18 ^a	11,0	ND ¹	ND ¹	-	ND ¹	ND ¹	-	ND ¹	ND ¹	-
10⁷ EC	EC	8,08 $\pm$ 0,22 ^{a, A}	7,74 $\pm$ 0,28 ^{a, A}	4,2	5,34 $\pm$ 0,64 ^{a, B, C}	4,86 $\pm$ 0,26 ^{a, B}	9,1	3,84 $\pm$ 0,13 ^{a, B, D, E}	3,71 $\pm$ 0,24 ^{a, B, C}	3,3	5,03 $\pm$ 0,12 ^{a, B, C, F}	4,82 $\pm$ 0,17 ^{a, B, D}	4,1
10⁴ SG	SG	4,04 $\pm$ 0,38 ^{a, A}	3,49 $\pm$ 0,14 ^{a, A}	13,5	ND ¹	ND ¹	-	7,07 $\pm$ 0,38 ^{a, A, C}	6,45 $\pm$ 0,22 ^{a, B}	8,7	7,19 $\pm$ 0,18 ^{a, B, C}	6,91 $\pm$ 0,24 ^{a, B}	4,0
10⁴ SP	SP	4,14 $\pm$ 0,21 ^{a, A}	3,57 $\pm$ 0,25 ^{a, A}	13,6	7,82 $\pm$ 0,07 ^{a, B, D}	7,71 $\pm$ 0,06 ^{a, B}	1,4	7,28 $\pm$ 0,12 ^{a, C}	6,86 $\pm$ 0,20 ^{a, C}	5,8	7,57 $\pm$ 0,23 ^{a, C, D}	7,02 $\pm$ 0,12 ^{a, C, D}	7,3
EC + SG (1:1)	EC	4,26 $\pm$ 0,11 ^a	3,87 $\pm$ 0,23 ^b	9,3	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-
	SG	3,96 $\pm$ 0,24 ^a	3,10 $\pm$ 0,17 ^b	21,7	ND ²	ND ²	-	6,66 $\pm$ 0,33 ^a	6,05 $\pm$ 0,19 ^a	9,1	7,22 $\pm$ 0,13 ^a	6,93 $\pm$ 0,17 ^a	4,1
EC + SG (1.000:1)	EC	7,52 $\pm$ 0,20 ^a	6,90 $\pm$ 0,18 ^b	8,2	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-
	SG	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-	6,47 $\pm$ 0,27 ^a	6,14 $\pm$ 0,13 ^a	5,1	7,59 $\pm$ 0,12 ^a	7,35 $\pm$ 0,14 ^a	3,1
EC + SP (1:1)	EC	4,13 $\pm$ 0,11 ^a	3,88 $\pm$ 0,12 ^b	5,9	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-
	SP	2,85 $\pm$ 0,15 ^a	2,26 $\pm$ 0,24 ^b	20,7	7,42 $\pm$ 0,03 ^a	7,31 $\pm$ 0,07 ^a	1,4	7,20 $\pm$ 0,20 ^a	6,72 $\pm$ 0,16 ^a	6,7	7,22 $\pm$ 0,11 ^a /	6,36 $\pm$ 0,10 ^b	11,9
EC + SP (1.000:1)	EC	6,93 $\pm$ 0,11 ^a	6,16 $\pm$ 0,15 ^b	11,2	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-	ND ²	ND ²	-
	SP	2,56 $\pm$ 0,24 ^a	2,20 $\pm$ 0,17 ^a	14,0	7,24 $\pm$ 0,04 ^a	7,14 $\pm$ 0,37 ^a	1,4	5,95 $\pm$ 0,16 ^a	5,62 $\pm$ 0,20 ^a	5,4	7,13 $\pm$ 0,13 ^a	6,17 $\pm$ 0,11 ^a	13,4

^{a, b} Los valores seguidos por letras minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes para la misma técnica (p < 0,05).

^{A, B} Los valores seguidos por letras mayúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes para las diferentes técnicas entre los mismos medios para las cepas puras (p < 0,05).

¹ ND: no detectado. Límite de detección 4,00 x 10² UFC/ml.

² ND: no detectado. Límite de detección 1,00 x 10² UFC/ml.

3.2.2. Aislamiento de *Salmonella* spp. inmóviles y *E. coli* inoculadas en guano estéril

Los resultados de los aislamientos de las cepas inoculadas están detallados en la **Tabla 25**. En cuanto a los ensayos con las cepas puras (control) en concentraciones iniciales de 10^4 UFC/25g en guano se observó que SP pudo ser aislada en las cuatro técnicas estudiadas (TTD, TT, TTH y MSRV), mientras que SG se aisló en tres de ellas (TT, TTH y MSRV) y EC solo se aisló en la técnica MSRV. Sin embargo, esta misma cepa al ser inoculada en concentración de 10^7 UFC/25g pudo aislarse en todas las técnicas ensayadas. Con respecto a la inoculación de EC + SI en relación 1:1 en guano, se observó que EC sólo se aisló en MSRV para ambos casos y SG pudo ser aislada en MSRV, TTH y TT, mientras que SP se aisló en todas las técnicas utilizadas. Por otro lado, en la inoculación de EC + SI en relación 1000:1 en guano se observó que EC se aisló en MSRV, y en MSRV y TT para el enfrentamiento de SG y SP, respectivamente. Mientras que SG pudo ser aislada en MSRV, TTH y TT, y SP se aisló en todas las técnicas utilizadas.

Tabla 25. Aislamiento mediante los métodos medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), caldo tetratonato (TTD y TT) y caldo tetratonato Hajna (TTH) de las cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) CUB 55/10, S. ser. Gallinarum biovar Poullorum (SP) INTA Balcarce 90-142 y *E. coli* (EC) en guano de aves contaminados artificialmente

Tratamiento		Nº de muestras positivas/Nº total de muestras			
		TTD	TT	TTH	MSRV
EC (10^4)		0/6	0/6	0/6	6/6
EC (10^7)		6/6	6/6	6/6	6/6
SG (10^4)		0/6	6/6	6/6	6/6
SP (10^4)		6/6	6/6	6/6	6/6
EC + SG (1:1)	EC	0/6	0/6	0/6	4/6
	SG	0/6	6/6	6/6	6/6
EC + SG (1000:1)	EC	0/6	0/6	0/6	6/6
	SG	0/6	6/6	6/6	6/6
EC + SP (1:1)	EC	0/6	0/6	0/6	4/6
	SP	6/6	6/6	6/6	2/6
EC + SP (1000:1)	EC	0/6	2/6	0/6	4/6
	SP	6/6	4/6	6/6	2/6

4. DISCUSIÓN

En este capítulo se estudiaron 4 métodos de aislamiento para la detección de *Salmonella* spp. móviles e inmóviles en muestras de guano de gallina de postura contaminado artificialmente. Los enfoques para disminuir el tiempo de detección incluyen reducir la duración de los enriquecimientos no selectivos y/o selectivos, cambiar las formulaciones de caldo y alterar las temperaturas de incubación. Sin embargo, diferentes autores encontraron resultados contradictorios, mientras que algunos (Chen *et al.*, 1993; Daquigan *et al.*, 2016) reportaron que *Salmonella* spp. se pudo recuperar después de 5 a 6 h en un caldo de preenriquecimiento no selectivo y superar los efectos tóxicos del enriquecimiento selectivo, otros autores (Mohr *et al.*, 1974; van Schothorst y van Leusden, 1975; D'Aoust y Maishment, 1979) demostraron que un menor tiempo de incubación no logró recuperar esta bacteria.

Para el caso de las *Salmonella* spp. móviles, los resultados indicaron que el método de MSRV fue mejor que los métodos de tetrionato (TT y TTD) y tetrionato Hajna (TTH) para la recuperación de la bacteria inoculada en este tipo de muestra. Eriksson y Aspan (2007) encontraron que un método similar al MSRV, pero con diferentes medios de cultivos selectivos diferenciales (agar xilosa lisina desoxicolato y agar verde brillante), fue el método más sensible y específico, cuando se comparó con el método NMKL71 (Nordic Committee on Food Analysis 71:5: 1999), 3 métodos comerciales basados en ELISA y 4 basados en PCR en muestras fecales de bovinos, cerdos y aves contaminadas artificialmente con diferentes serovariedades de *Salmonella* spp., incluidas las estudiadas en este trabajo de tesis. Fujihara *et al.* (2016) informaron que se aisló *Salmonella* spp. con mayor éxito a partir de muestras fecales contaminadas artificialmente después del enriquecimiento en caldo de tetrionato Hajna o en agar Rappaport semisólido modificado que en caldo Rappaport. Sin embargo, Soria *et al.* (2012), utilizando guano de aves de postura contaminado artificialmente, encontraron que la SE y EXA de un método similar al TT, con agar xilosa lisina desoxicolato con o sin tergitol 4, y agar EF-18, como medios de cultivos sólidos selectivos-diferenciales, fueron tan altos como un método similar a MSRV, con los mismos medios de cultivos selectivos-diferenciales señalados anteriormente, para cepas SE y ST. Esos autores utilizaron 2 cepas de *Salmonella* spp. que se utilizaron en este trabajo de tesis (ST ATCC 13311 y SE ATCC 13076) y el límite de detección para SE ATCC 13076 fue mejor en ese informe, que en los resultados obtenidos en este trabajo. Las diferencias en la concentración inicial de bacterias totales y enterobacterias en las muestras de guano y/o los medios de cultivo selectivos diferenciales utilizados podrían explicar estos resultados.

En este estudio no se indujo daño sobre la bacteria inoculada. El recuento de *Salmonella* spp. en ATS y MC no fue significativamente diferente para todas las cepas y el porcentaje de células dañadas estuvo entre 8,26 y 11,54 %. Se utilizó un preenriquecimiento en APB para estimular el crecimiento de *Salmonella* spp. y permitir la recuperación de células dañadas (Gast, 2013; Soria y Bueno, 2016). Se sabe que el preenriquecimiento no es aconsejable cuando se analizan muestras con contenido

intestinal o heces, con un gran número de organismos competidores que podrían superar a *Salmonella* spp. en el caldo no selectivo (Gast, 2013). Sin embargo, la concordancia entre TTD y TT fue buena en nuestro estudio, sin ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) entre estos métodos. Por ello, no se encontró ninguna ventaja con el uso de un enriquecimiento selectivo sin el paso de preenriquecimiento en las muestras de guano para las cepas de *Salmonella* spp. móviles. El método estándar ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020 (ISO, 2020) para la detección de *Salmonella* spp. en heces de animales, se incluye en muchos planes nacionales de sanidad avícola, esta técnica utiliza en el paso de enriquecimiento selectivo el medio MSRV para la detección de *Salmonella* spp. móvil. La eficacia de este medio se basa en la capacidad de *Salmonella* spp. para migrar a través del medio selectivo por delante de los microorganismos móviles competidores, produciendo así halos opacos de crecimiento (Oxoid, 2006). Gelinski *et al.*, (2002) consideraron un halo blanco con un radio mayor a 10 mm como una migración positiva alrededor del punto. Sin embargo, Fujihara *et al.* (2016) informaron que la SE de MSRV no estaba restringida por el volumen de inóculo y que el diámetro de la zona de migración en este medio dependía de los serovares de *Salmonella* spp. En este ensayo, una cepa ST (CUB 59/10) mostró solo una zona periférica en alguna concentración inicial de la misma. Esta cepa pudo aislarse de la zona central, cuando no había una zona periférica. Wu *et al.* (2012) reportaron que otra cepa de ST (LB5010) no mostró un efecto "halo" en el medio MSRV, y el medio permaneció azul alrededor de la gota inoculada. Sin embargo, en este trabajo de tesis cuando se repitió el ensayo con diferentes muestras de guano, usando ST CUB 59/10, los halos opacos de crecimiento aparecieron en medio MSRV. Esto indicó que el diámetro de la zona de migración también dependió de la muestra.

El tipo de muestra, y especialmente la composición de la microbiota acompañante, es de considerable importancia para la eficacia de un medio de cultivo específico. El crecimiento de bacterias que no son *Salmonella* spp. pueden alterar la lectura de las placas, ya que pueden no obtenerse colonias bien aisladas de *Salmonella* spp. (Busse, 1995). Petersen (1997) informó que la combinación de los 2 medios de cultivos disminuyó la cantidad de resultados falsos negativos, lo que lleva un costo adicional. En este estudio, se utilizaron tres medios de cultivo selectivos-diferenciales (HE, SS y SB), y hubo diferencias significativas entre los métodos de aislamiento para los mismos medios de cultivo, lo que fortaleció el uso de los pasos de preenriquecimiento y enriquecimiento. Aunque los coeficientes *kappa* mostraron que la concordancia fue de buena a excelente en los 3 medios de cultivos selectivos-diferenciales para *Salmonella* spp. móviles, en general, el agar SB mostró valores más bajos en estos parámetros. Resultados similares fueron informados por Cox *et al.*, (1972), quienes compararon varios medios de cultivo para el aislamiento de *Salmonella* spp. de guano de aves de corral y de los productos alimenticios para aves de corral. Estos autores encontraron el mayor porcentaje de aislamientos positivos en agar SS (41,6 %), mientras que los agares HE y SB tuvieron 22,2 % y 13,8 % de recuperación positiva, respectivamente.

Si bien los valores de concordancia entre técnicas para la recuperación de cepas inmóviles estuvieron entre débil a muy buena, los límites de detección fueron más altos que los encontrados en las cepas móviles. Se conoce que, a diferencia de otras *Salmonella*, las inmóviles (SP y SG) no son intensamente excretadas a través de las heces (Berchieri *et al.*, 1995) y que su excreción depende de la susceptibilidad del lote a la infección por estas bacterias. Proux *et al.*, (2002) revelaron que, si el control de este tipo de *Salmonella* spp. se basa exclusivamente en el análisis bacteriológico de guano e hisopados ambientales, es difícil de detectarlas; ya que sólo pudieron aislar a estas bacterias mediante cultivos que fueron efectuados a partir del hígado y bazo de pollitos infectados, mientras que el guano y los hisopados ambientales fueron todos negativos en los cultivos efectuados en ese mismo lote de aves. Por otro lado, el anexo D de la norma ISO 6579 indica que *Salmonella* spp. inmóviles no parecen tener la capacidad de sobrevivir por tiempos prolongados en muestras ambientales y, por lo tanto, son raramente detectadas en muestras de guano, independientemente del método que se utilice. En el mismo anexo D y Poppe *et al.*, (2004) se indica que el medio MSRV es inadecuado para el aislamiento de cepas de *Salmonella* spp. inmóviles. Sin embargo, en el presente estudio de tesis, de manera similar que lo informado por Soria *et al.*, (2012), se pudo recuperar este tipo de *Salmonella*, pero con límites de detección relativamente altos ($1,3 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^9$ UFC/25g). A su vez, se observó que la presencia de otras bacterias, como *E. coli*, en el guano alteraron la tasa de aislamiento de SG y SP. Esto demuestra que, a diferencia de lo que ocurre con los serovares móviles de *Salmonella* spp., son necesarias altas concentraciones de SG y/o SP en guano para que se puedan aislar estas bacterias, dado que la microbiota acompañante afecta de sobremanera la tasa de aislamiento de las mismas.

5. CONCLUSIONES

- ✓ El método de MSRV es mejor que los métodos de que utilizan tetracionato (TTD, TT y TTH) para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de guano contaminadas artificialmente, tanto para las cepas móviles como para las inmóviles.
- ✓ Los límites de detección, en guano contaminado artificialmente son mejores en *Salmonella* spp. móviles que inmóviles.
- ✓ La microbiota acompañante y la concentración inicial de *Salmonella* spp. son determinantes, en la tasa de aislamiento de *Salmonella* spp. inmóviles en guano.
- ✓ La combinación de HE y SS como medios sólidos selectivos- diferenciales se puede utilizar para disminuir el número de resultados falsos negativos.

CAPÍTULO 2

**PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP. EN
GRANJAS DE GALLINAS DE POSTURA, DE
POLLOS PARRILLEROS E HÍGADOS DE POLLO
PARA CONSUMO**

1. INTRODUCCIÓN

La actividad avícola comprende la producción de carne aviar y la de huevos para consumo. Ambos productos derivan de cadenas productivas que, si bien poseen aspectos en común desde el punto de vista de la biología, son diferentes en cuanto a la genética que les da inicio, las instalaciones, los actores, los establecimientos, entre otros delimitando claramente actividades distintas con características propias (Lamelas *et al.*, 2011).

Al momento de los ensayos de esta tesis, en la provincia de Entre Ríos se encontraban aproximadamente el 43 % de las granjas avícolas del país (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2016). Aunque la producción de aves en Entre Ríos se encuentra ampliamente distribuida por casi todo su territorio, del total de granjas de pollos parrilleros existentes, se destacaba la costa del río Uruguay, la cual concentraba alrededor del 70 % (Schell *et al.*, 2011), principalmente los departamentos de Uruguay, Colón y Gualaguaychú (Martínez y Borghello, 2019). A su vez, a nivel nacional, el 21 % de las granjas avícolas se dedicaba a la producción de huevos y el 65,4 % de la producción de huevos se localizaba en las provincias de Buenos Aires (42,7 %) y Entre Ríos (22,7 %). Esta última tenía aproximadamente 292 granjas de ponedoras comerciales, más del 70 % de las mismas estaban concentradas en la costa del río Paraná principalmente los departamentos de Paraná y Diamante (Schell *et al.*, 2011, Lamelas *et al.*, 2011).

Salmonella spp. puede ser introducida en las granjas de cría aves de corral de varias maneras, ya sea con pollitos infectados, animales domésticos, roedores, humanos, equipos, agua y alimento (Shivaprasad, 2003; Gast, 2008). Las infecciones con bacterias del género *Salmonella* son responsables de una variedad de enfermedades agudas y crónicas en las aves. Estas enfermedades continúan causando significativas pérdidas económicas en diferentes países. Del mismo modo, los lotes de aves infectadas son uno de los más importantes reservorios de *Salmonella enterica* que pueden ser transmitidas al ser humano a través de los diversos pasos en la cadena alimentaria, como la producción, procesamiento, distribución, comercialización, manipulación y preparación (Gast y Porter, 2020). La infección por *Salmonella* spp. en humanos constituye una de las principales causas de morbilidad en el país, siendo uno de los patógenos más frecuentemente aislados en infecciones de transmisión alimentaria. En Europa y en Argentina, se observa que tanto *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (SE) y serovariedad Typhimurium (ST) son las serovariedades más frecuentemente asociadas con enfermedades humanas (Foley *et al.*, 2008; Loharikar *et al.*, 2013). A su vez los serotipos como ST y SE pueden infectar a las aves y persistir en el producto final induciendo o no la enfermedad clínica en estos animales durante la crianza (Gama *et al.*, 2003).

Por otro lado, las infecciones producidas por *Salmonella* ser. Gallinarum con las dos biovariedades Gallinarum (SG) y Pullorum (SP) ocasionan infecciones sistémicas agudas en las aves. La morbilidad y mortalidad debidas a la infección por estas

biovariedades dependen de distintas variables: edad y estado nutricional de las aves, manejo de los lotes e infecciones concurrentes. Las mayores tasas de mortalidad, en algunos casos, suelen llegar al 100 %. Las pérdidas económicas causadas por estas biovariedades pueden ser muy altas, no sólo por la pérdida de animales debido a la mortalidad, sino también por los costos veterinarios involucrados, eliminación de las aves muertas, saneamiento de las instalaciones infectadas, entre otros (Chacana y Terzolo, 2003). La infección por SG puede ocurrir tanto por vía horizontal, como vertical. La transmisión horizontal es más significativa para esta biovariedad (Barrow y Freitas Neto, 2011). La transferencia horizontal puede ocurrir por la ingesta de heces infectadas o por canibalismo. En cuanto a la tasa de transmisión vertical, la presencia de SG en los huevos provenientes de gallinas infectadas es relativamente baja. Se ha encontrado que sólo un 3 % de los huevos puestos por gallinas infectadas transportaban la bacteria (Chacana y Terzolo, 2003). Por otro lado, la transmisión vertical está asociada con infecciones persistentes en ausencia de casos clínicos (Berchieri Júnior *et al.*, 2000).

Dentro de los productos avícolas comercializados se encuentran las menudencias que representan cerca de 5 % del peso vivo, o unos 12.500 kg en una faena de 100 mil aves/día de 2,5 kg de peso vivo (Nunes, 2020). Las menudencias (vísceras comestibles) incluyen el hígado, el corazón, la molleja y el cuello de pollo (Código Alimentario Argentino, 2023). Las menudencias (predominantemente el hígado) pueden estar contaminadas con bacterias, por ejemplo, *Salmonella* spp. (El-Aziz, 2013; Molla y Mesfin, 2003), que presenta un importante problema de salud pública mundial, con una morbilidad sustancial, además de tener un impacto económico significativo (Sharma y Carlson, 2000).

La contaminación con *Salmonella* spp. en productos avícolas puede ocurrir en cualquier paso de la cadena alimentaria, que consiste en la producción, procesamiento, distribución, comercialización minorista, manipulación y preparación (Dookeran, *et al.*, 2012). La modernización de las granjas avícolas y la globalización del comercio de cría de aves también han influido en la contaminación bacteriana de los productos avícolas (Velge *et al.*, 2005). En Argentina, el Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas del Ministerio de Salud, creado en 2011, ha incorporado la salmonelosis a las principales enfermedades zoonóticas del país (Ministerio de Salud, 2011). Diferentes estudios en este país muestran la importancia de SE y ST en gastroenteritis en niños y adultos (Mancini, 2013; Torres *et al.*, 2016).

Distintos serotipos de *Salmonella* spp. afectan a las aves y seres humanos, por lo que su detección es importante para instaurar medidas de control (Gast y Porter, 2020). Al no haber datos, o estar desactualizados, de prevalencia de esta bacteria en granjas de la zona de mayor concentración avícola de Entre Ríos, los objetivos de este capítulo fueron:

- Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. y de los serovares Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum en granjas de gallinas de postura y pollos parrilleros, e

hígados de pollo para consumo en la zona de mayor densidad de granjas avícolas de la provincia de Entre Ríos.

- Estudiar la capacidad discriminatoria de las técnicas y los medios de cultivos sólidos selectivos-diferenciales, que se utilizaron para el aislamiento *Salmonella* spp. en cada estudio, y la concordancia entre ellos.
- Identificar factores de riesgos para *Salmonella* spp. en granjas de gallinas ponedoras y pollos parrilleros en la zona de mayor densidad de granjas avícolas de la provincia de Entre Ríos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTREO

2.1.1. Tamaño de muestra

2.1.1.1. Granjas de gallinas de postura

En la época que se muestreó, la provincia de Entre Ríos tenía un total de 292 granjas de gallinas ponedoras comerciales (Schell et al., 2011). Más del 70 % (217) de las mismas estaban concentradas en los departamentos de Paraná con 185 granjas (63 %) y Diamante con 32 granjas (11 %). Es por ello que se seleccionaron estos dos departamentos para ser muestreados (**Figura 5**).

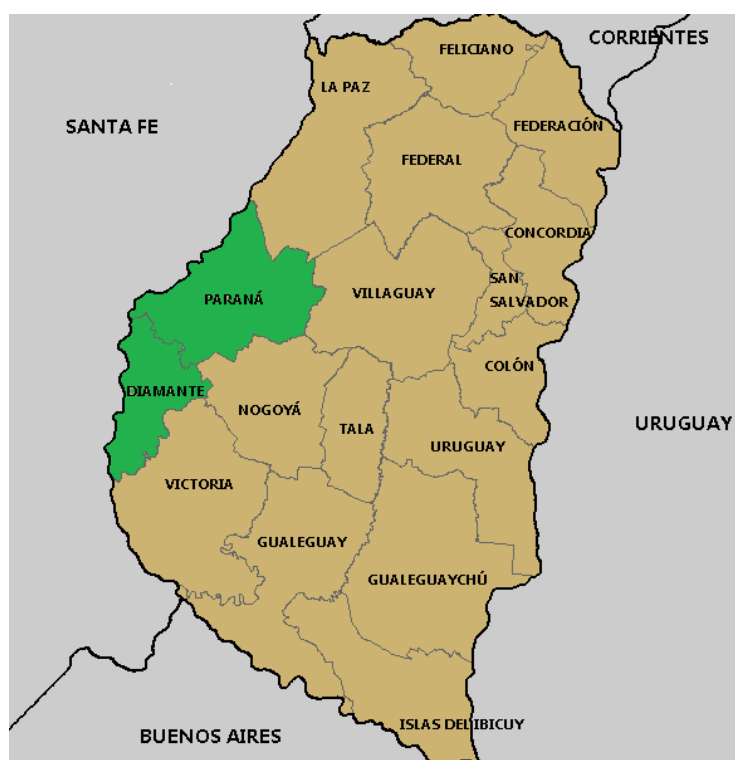


Figura 5. Mapa de Entre Ríos. En verde se destacan los departamentos donde se encuentran las granjas de gallinas ponedoras que fueron muestreadas

Para calcular el número de granjas, se consideró una prevalencia esperada del 50 % (sin datos previos), un nivel de confianza del 95 % y una precisión del 10,3 %. En base a ello, el cálculo fue determinado por las siguientes ecuaciones (Mateu y Casal, 2003):

$$n = \frac{Z^2 p q}{B^2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde:

- n= tamaño de muestra para población infinita.
- Z= nivel de confianza (1,96 para el 95 % de confianza).
- p= probabilidad de éxito, o proporción esperada (0,50 según estudios previos).
- q= probabilidad de fracaso, es decir 1 – p (1 – 0,50 = 0,50).
- B= precisión, es decir error máximo admisible en términos de proporción (0,103).

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,5 \times (1-0,5)}{0,103^2} = 90$$

El valor de n indica el tamaño de la muestra para una población infinita, pero en este caso se trabajó con una población finita por lo tanto se aplicó la Ecuación 2:

$$n' = \frac{1}{1/n + 1/N} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde:

- n' = tamaño de muestra necesario.
- n = tamaño de muestra según ecuación 1 (90).
- N = tamaño de la población (217).

$$n' = \frac{1}{(1/90) + (1/217)} = 63$$

De esta forma considerándose a n como 90 granjas y N como 217 granjas, aplicando la ecuación 2, la cantidad de granjas a muestrear (n') fue de 63. De esta forma, se podría afirmar que si la prevalencia es realmente del 50 %, en el 95 % de los casos la misma oscilará entre un 40 % y un 60 %.

2.1.1.2. Granjas de pollos parrilleros

Según los datos disponibles en el momento del muestreo de un total de 2.490 de granjas y plantas de incubación que poseía la provincia de Entre Ríos, 822 pertenecían al departamento Uruguay, 492 al departamento Colón y 251 al departamento Gualeguaychú. Un total de 1.565 granjas se encontraban en estos tres departamentos (Schell *et al.*, 2011). Es por ello que se tomaron muestras de estos 3 departamentos (**Figura 6**).

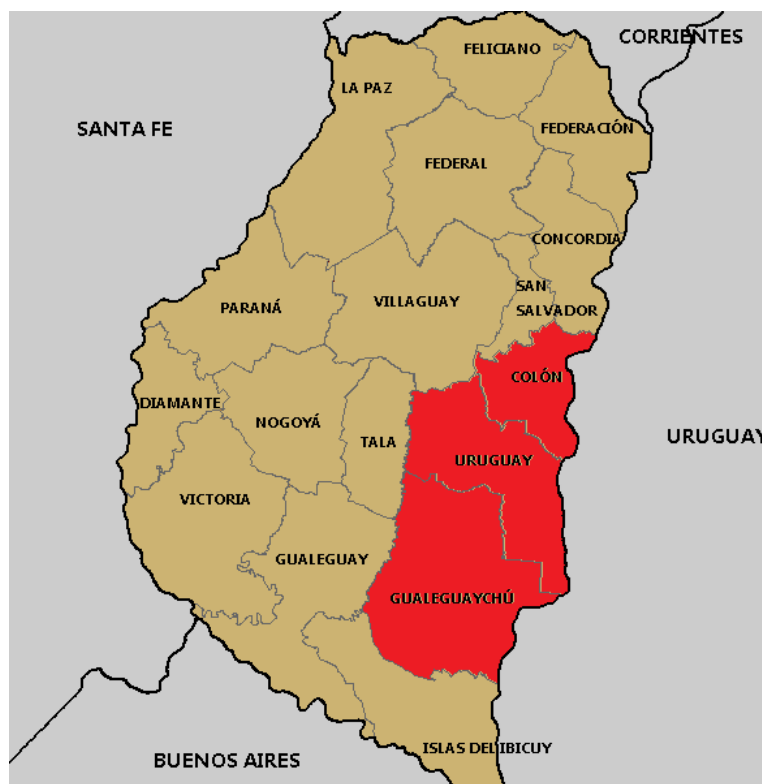


Figura 6. Mapa de Entre Ríos. En rojo se destacan los departamentos donde se encuentran las granjas de pollos parrilleros que fueron muestreadas

Para calcular el número de granjas a muestrear se definió una prevalencia esperada de *Salmonella* spp. del 45 % (en base a resultados preliminares de SENASA, tomando 10 empresas del país, (SENASA, 2012), nivel de confianza del 95 % y una precisión del 9,8 %. En base a ello el cálculo fue determinado por las **Ecuaciones 1** y **Ecuaciones 2** detalladas anteriormente (Mateu y Casal, 2003):

$$n = \frac{1,96^2 \cdot 0,45 \cdot (1-0,45)}{0,098^2} = 99$$

$$n' = \frac{1}{(1/99) + (1/1565)} = 93$$

De esta forma considerándose a n como 99 granjas y N como 1565 granjas, aplicando la ecuación 2, la cantidad de granjas a muestrear (n') fue de 93 granjas. En base a ello, se podía afirmar que si la prevalencia era realmente del 45 %, en el 95 % de los casos, la misma oscilará entre un 35,2 % y un 54,8 %.

2.1.1.2. Hígados de pollos parrilleros

Al momento de comenzar los muestreos en los departamentos Uruguay, Colón y Gualeguaychú (Schell *et al.*, 2011), además de ser los tres departamentos con el mayor número de granjas de pollos parrilleros, concentraban la mayoría de frigoríficos de aves que poseía la provincia de Entre Ríos (Ministerio de Producción, Turismo y Desarrollo Económico, 2015). Existían un total de 9 frigoríficos de aves, de los cuales 5 se encontraban en el departamento de Uruguay, 3 en el de Colón y 1 en el de Gualeguaychú. Para calcular el número de muestras, se consideró una prevalencia esperada del 50 % (al no contar con datos previos), un nivel de confianza del 99 % y una precisión del 5 %. En base a ello, el cálculo fue determinado por la **Ecuación 1** detallada anteriormente (Mateu y Casal, 2003):

$$n = \frac{2,58^2 \times 0,5 \times (1-0,5)}{0,05^2} = 666$$

El valor de n indica el tamaño de la muestra para una población infinita, en este caso se consideraron muestras infinitas debido a que no se sabía la cantidad de pollos faenados por los 9 frigoríficos seleccionados. De esta forma, se puede afirmar que si la prevalencia es realmente del 50 %, en el 99 % de los casos la misma oscilará entre un 45 % y un 55 %.

2.1.2. Criterio del muestreo

Para las granjas avícolas, teniendo en cuenta la cantidad existente de las mismas en cada departamento al momento del muestreo se estimó el porcentaje de representatividad para cada uno de ellos. De esta forma para el caso de las granjas de gallinas ponedoras, dentro de los 217 establecimientos existentes al momento del muestreo, Paraná poseía un 85 %, mientras que Diamante el 15 % (Schell *et al.*, 2011). De este modo se dividió el número de granjas a muestrear de acuerdo al porcentaje que fue aportado por cada departamento. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado entre septiembre de 2015 y diciembre de 2016 y se recibió la colaboración de veterinarios del sector avícola. Se tomaron muestras en 63 granjas, de las cuales 51 pertenecían al departamento Paraná y 12 del departamento de Diamante. Se tomó como mínima unidad de muestreo por granja un galpón. Como criterio para la toma de muestra se fijó que, si la granja tenía de 1 a 4 galpones en producción se tomarían muestras de 1 galpón, en cambio cuando tuvieran más de 4 galpones en producción se tomarían muestras de 2 de ellos, siempre seleccionando los galpones que tuvieran aves de mayor edad. Esto último debido a la mayor probabilidad de contaminación por *Salmonella* spp. en aves de mayor edad (Van Hoorebeke *et al.*, 2010).

Y para el caso de granjas de pollos parrilleros de los 1.565 establecimientos, Uruguay poseía el 53 %, Colón el 31 %, y Gualeguaychú el 16 % (Schell *et al.*, 2011). De

este modo se dividió el número de granjas de pollos parrilleros a muestrear de acuerdo al porcentaje que fue aportado por cada departamento. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado entre abril de 2014 y junio de 2015 y se recibió la colaboración de empresas del sector. Se tomaron muestras en 93 granjas, de las cuales 47 pertenecían al departamento Uruguay, 31 al de Colón y 15 al de Gualaguaychú. Se tomó como mínima unidad de muestreo por granja un galpón. A su vez, para el caso de las muestras de alimento balanceado y aves muertas se tomó el criterio de que en aquellos establecimientos con 5 o más galpones se muestrearon dos de ellos. Mientras que para la toma de muestra de cama en los galpones se tomaron muestras de dos galpones independientemente de la cantidad que existiera en la granja. En todos los casos fueron seleccionados los galpones donde las aves tenían como mínimo 28 días de edad y preferentemente en los lotes de mayor edad dado que tienen más probabilidades de estar contaminadas con *Salmonella* spp. (Van Hoorebeke *et al.*, 2010).

Para el caso del hígado para consumo, teniendo en cuenta la cantidad de frigoríficos existentes se dividió el tamaño de muestra que se debía tomar por la cantidad de ellos. De esta forma se tomaron 74 muestras por frigorífico. Se realizó un muestreo aleatorio simple entre octubre de 2015 y mayo de 2016.

2.1.3. Tipos de muestras

Para el estudio de granjas de pollos parrilleros y gallinas de postura se escogieron 3 (alimento, aves muertas e hisopado de cama) y 5 (alimento, aves muertas, hisopado cloacal, huevo y guano) tipos de muestras, respectivamente. Las mismas fueron refrigeradas y trasladadas hasta el Laboratorio de Sanidad Aviar de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concepción del Uruguay, Entre Ríos. Para el estudio de prevalencia de *Salmonella* spp. en frigoríficos de aves se escogió como muestra hígados de pollos. La elección de esta muestra fue debido, por un lado, al impedimento del ingreso a los frigoríficos de aves y, por otro lado, a que el hígado es uno de los órganos blancos de esta bacteria (Gast y Porter, 2020).

2.1.3.1. Alimento

Las muestras se extrajeron desde las tolvas internas. Si el galpón no contaba con las mismas, el alimento se tomó desde los comederos o bien desde el silo exterior. En todos los casos, se recolectaron 3 muestras de 3 ± 1 kg de alimento en bolsas plásticas por galpón. Para la toma de muestras se utilizó otra bolsa a fin de ayudar a llegar al peso preestablecido como muestra, o si la muestra se tomaba de los silos externos se tomó directamente de las compuertas que existen en los mismos.

2.1.3.2. Hisopados de cama

Las muestras consistían en dos pares de cofias estériles embebidas en una solución estéril de cloruro de sodio al 0,85 % p/v. Las cofias se colocaron en los pies sobre bolsas de polietileno, que se colocaban una vez ingresado al galpón, para evitar contaminaciones externas al galpón, y se procedió a caminar por el galpón en forma de zig-zag, considerando el uso de 1 par de cofias para el 50 % de superficie y el otro par para la superficie restante, las muestras se colocaron en bolsas estériles para homogeneizadores tipo Stomacher® (Bueno *et al.*, 2016; Barroso, 2012).

2.1.3.3. Aves muertas

Se recolectaron hasta 10 aves muertas del día por galpón muestreado. En el caso de que en dicho galpón no se encontraran aves muertas o las mismas ya hubiesen sido eliminadas, se procedió a muestrear aves muertas de otro galpón. Las muestras fueron introducidas en bolsas plásticas de residuos para ser transportadas.

2.1.3.4. Guano

En las granjas con galpones convencionales, el guano se recolectó con cucharas plásticas estériles de unos 60 puntos diferentes, debajo del foso de las jaulas. En las granjas con galpones automatizados, el guano se muestreó desde las cintas transportadoras, previo funcionamiento del sistema automático. Se tomaron 2 muestras de guano de 150 g c/u por galpón en las diferentes filas.

2.1.3.5. Huevos

De cada galpón se recolectaron tres maples de treinta huevos cada uno, solicitando al propietario de la granja o encargado, la selección de los huevos más sucios. Los mismos fueron embolsados en la misma granja para evitar posibles contaminaciones cruzadas.

2.1.3.6. Hisopados cloacales

De cada galpón se tomaron 30 hisopados cloacales de aves vivas, recolectando 2 *pooles* de 15 hisopos cada uno. Las aves fueron seleccionadas al azar y para la toma de cada muestra se utilizaron hisopos estériles previamente humedecidos en solución fisiológica estéril (NaCl 0,85 % p/v). Una vez extraída el ave de la jaula, se abrió el plumaje de la zona cloacal y se introdujo el hisopo en la cloaca, rotándolo suavemente

dos o tres veces hasta obtener una muestra abundante de materia fecal. Estas muestras se envasaron en vasos recolectores de muestras.

2.1.3.7. Hígado de pollo

Los hígados de aves fueron adquiridos como hígados o menudos en comercios de las ciudades de Gualeguaychú, Larroque, Basavilbaso y Concepción del Uruguay, que se sabían que los mismos provenían de los frigoríficos involucrados en este estudio.

2.1.4. Aislamiento de *Salmonella* spp.

2.1.4.1. Alimento

Cada bolsa con 3 ± 1 kg de alimento fue procesada por duplicado, tomándose 2 submuestras de 25 g de alimento cada una. El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó por uno de los métodos descritos por Soria *et al.* (2011). Las muestras fueron preenriquecidas en 225 ml de caldo tripteína de soja (CTS, Merck, Alemania) con el agregado de sulfato de hierro II (Anedra, San Fernando, Argentina, 35 mg de sulfato de hierro II en 1000 ml de CTS). También, se llevó a cabo la preparación de un control, sin el agregado de la muestra a estudiar, sólo con el medio CTS con sulfato de hierro II. En todos los casos, la mezcla se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ entre 18 a 24 h. Luego, 1 ml del cultivo se transfirió a 10 ml de caldo tetraciónato (Acumedia-Neogen, Michigan, Estados Unidos) adicionado con 20 ml/l de solución iodo-ioduro de potasio (6 g de iodo; 5 g de ioduro de potasio; 20 ml de agua desmineralizada), solución verde brillante (0,1 %, Sigma, Steinheim, Alemania) y 40 mg/ml de novobiocina (Sigma, Steinheim, Alemania). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Luego, el mismo fue sembrado en estrías por agotamiento en los agares xilosa lisina desoxicolato (XLD; Oxoid Ltd. Inglaterra) con tergitol 4 (XLDT; 4,6 ml/l; Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), y EF-18 (Acumedia-Neogen, Michigan, Estados Unidos). Todas las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (**Figura 7**).

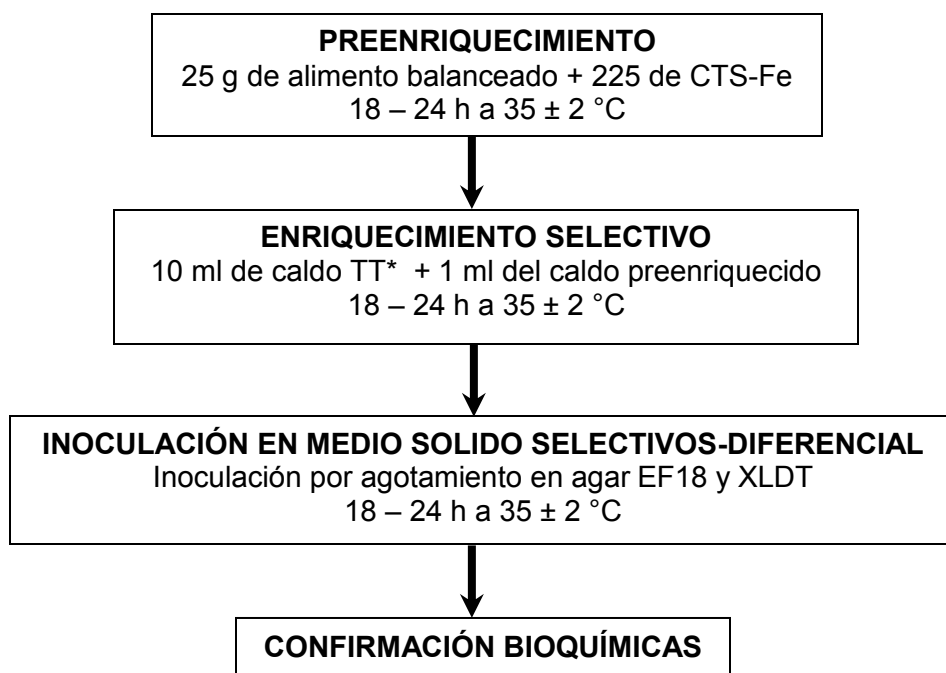


Figura 7. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en alimento balanceado.

CTS-Fe= caldo triptena de soja adicionado con sulfato de hierro II; TT*= caldo tetrionato adicionado con solución iodo-ioduro de potasio, verde brillante y novobiocina; EF-18 = agar EF-18; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato adicionado con tergitol 4.

2.1.4.2. Hisopado de cama

Cada bolsa tipo Stomacher® que contenía dos pares de cofias con las muestra de cama fue procesada según lo propuesto por Barroso (2012) y el anexo D de la norma ISO 6579 (ISO, 2002). De esta manera se preenriqueció en relación 1 en 10 (peso/volumen) en agua de peptona bufferada (APB, Merck, Darmstadt, Alemania). Esta mezcla se incubó a 35 ± 2°C durante 18-24 h. Luego, se inocularon 3 alícuotas de 30 µl del cultivo APB en medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV, Acumedia-Neogen, Lansing, Michigan) suplementado con 1 ml por litro de una solución de novobiocina (Sigma, Steinheim, Alemania) al 2 %. Las placas fueron incubadas a 41,5 ± 1°C durante 18-24 h. Posteriormente, por un lado, se tomó una ansada del centro y, por el otro, se tomó una ansada de la periferia (cuando existiera) y se sembró en estrías por agotamiento en placas de Petri conteniendo agar XLD (Oxoid) y agar Hektoen (HE; Acumedia-Neogen, Michigan, Estados Unidos). Las placas fueron incubadas a 35 ± 2°C durante 18-24 h (Figura 8).



Figura 8. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en hisopado de cama
 APB= agua de peptona bufferada; MSRV= medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado;
 XLD= agar xilosa lisina desoxicolato; H= Hektoen

2.1.4.3. Aves muertas

Se tomaron muestras de hisopado cloacal y de órganos. Para el primer caso, se utilizaron hisopos estériles previamente humedecidos en solución fisiológica estéril (NaCl 0,85 % p/v), para la toma de la muestra se abrió el plumaje de la zona cloacal y se introdujo el hisopo en la cloaca, rotándolo suavemente dos o tres veces hasta obtener una muestra abundante de materia fecal. Estas muestras se colocaron en pooles de 5 (o la cantidad de aves que se haya encontrado el día del muestreo) en tubos de ensayos estériles. Posteriormente a cada tubo se adiciono 5 ml (para pooles de hasta 3 hisopos) o 10 ml (para pooles de 4 o 5 hisopos) de caldo tetratiónato (Acumedia-Neogen) con el agregado de solución de yodo (6 g de iodo; 5 g de ioduro de potasio; 20 ml de agua desmineralizada), verde brillante (0,1 %, Sigma) y novobiocina (Sigma). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Luego, el mismo fue sembrado en estrías por agotamiento en agar MacConkey (MC, Acumedia-Neogen, Lansing, Michigan) y agar *Salmonella-Shigella* (SS, Merck, Darmstadt, Alemania). Todas las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h.

Por otro lado, se tomaron muestras de hígado, bazo y contenido de ciegos. Los hígados y bazos fueron procesados individualmente y en conjunto. Todos los órganos fueron sembrados, individualmente por inoculación directa, en agar MC (Acumedia-Neogen) y agar SS (Merck), tocando la cara interna del órgano sobre los agares y

sembradas en estrías por agotamiento, incubándose durante 24-48 h a 35 ± 2 °C. Además, por un lado se juntaron porciones de los hígados y bazos de las aves de cada galpón en grupos, y, por el otro, se juntaron grupos de ciegos y se diluyeron en relación 1/10 en caldo tetracionato (Acumedia-Neogen), con el agregado de solución de yodo, verde brillante y novobiocina, en la concentración detallada anteriormente. La mezcla se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Luego las muestras fueron sembradas por estrías de agotamiento en placas de agar MC (Acumedia-Neogen) y agar SS (Merck) e incubadas a 35 ± 2 °C durante 18-24 h (**Figura 9**).

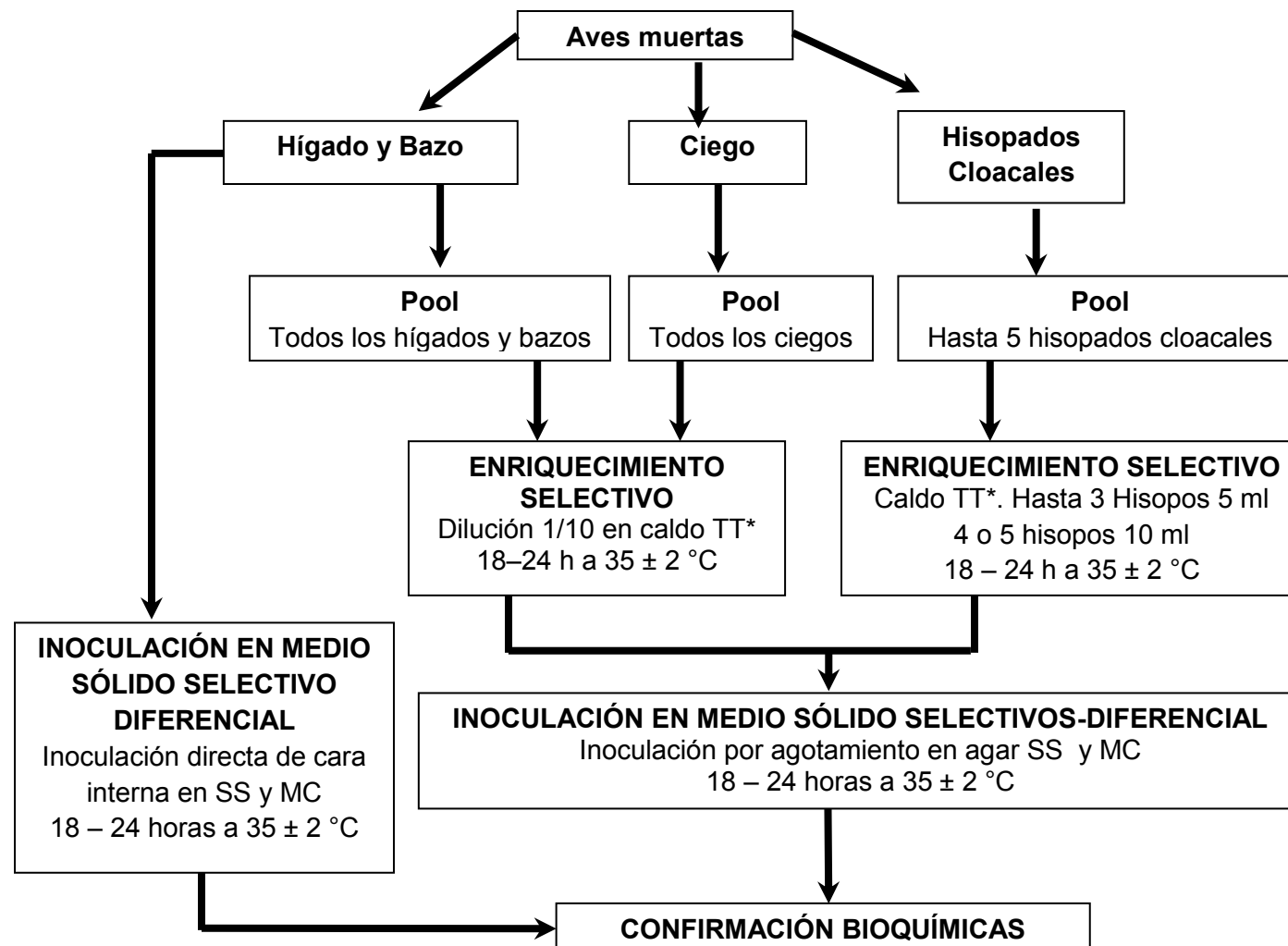


Figura 9. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en muestras provenientes de aves muertas

TT*= caldo tetratonato adicionado con solución iodo-ioduro de potasio, verde brillante y novobiocina; MC= agar MacConkey; SS= agar *Salmonella-Shigella*

2.1.4.4. Guano

De cada muestra de guano se tomaron 2 submuestras de 25 g cada una. El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó con el método MSRV detallado en el capítulo anterior. De esta forma las muestras fueron preenriquecidas en 225 ml de APB (Merck). También, se llevó a cabo la preparación de un control, sin el agregado de la muestra a estudiar, sólo con el medio APB. En todos los casos, la mezcla se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 h. Luego, se inocularon 3 alícuotas de 30 μl del cultivo APB en MSRV (Acumedia-Neogen) suplementado con 1 ml/l de una solución de novobiocina al 2 %. Las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Posteriormente, por un lado, se tomó una ansada del centro, y, por el otro, se tomó una ansada de la periferia (cuando existiera) y se sembró en estrías por agotamiento en placas de Petri que contenían agar HE (Acumedia-Neogen) y agar SS (Merck). Las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (**Figura 10**).

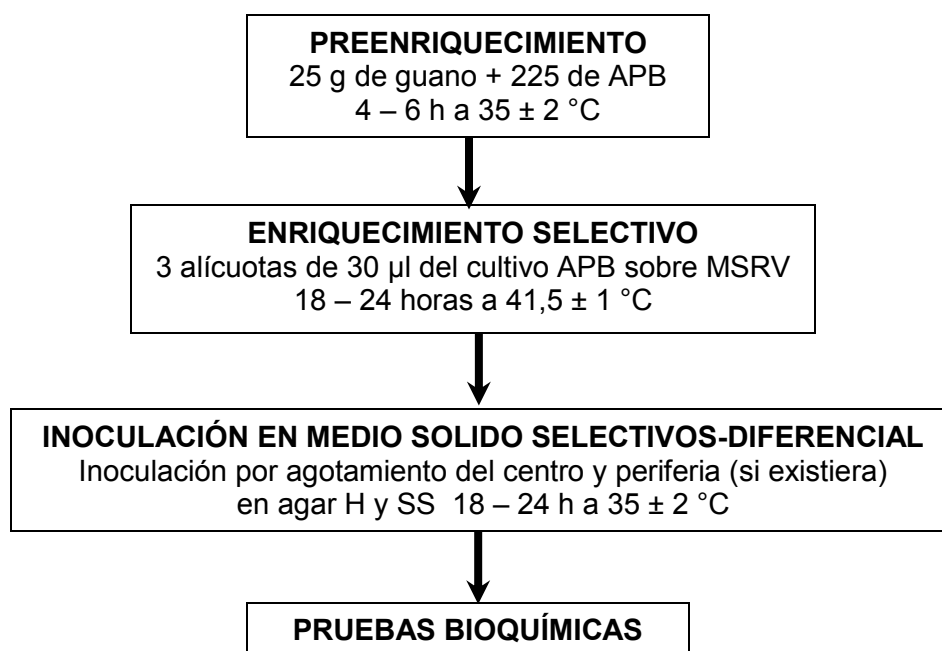


Figura 10. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en guano

APB= agua de peptona bufferada; MSRV= medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado; H= Hektoen; SS= agar *Salmonella-Shigella*.

2.1.4.5. Huevos

De cada galpón muestreado se realizaron 6 pools; de los cuales 3 fueron de cáscara y 3 de clara y yema. Cada pool se componía de 12 huevos/maple. Para la realización de los mismos, los huevos fueron quebrados. Por un lado, el contenido (clara y yema) fue introducido en bolsas de plástico estériles tipo Stomacher®, donde se

homogeneizó (Stomacher 440 circulator, Seward, Inglaterra) durante 2,5 minutos a 250 rpm. De cada bolsa estéril se tomó una submuestra de 50 ml. Por otro lado, las cáscaras fueron introducidas en bolsas de plástico estériles tipo Stomacher® homogeneizadas y finalmente se tomó una submuestra de 50 g. Las muestras fueron procesadas según lo propuesto por Soria *et al.*, (2012b). Para ello, se realizó una dilución 1/10 de las muestras, agregando 450 ml de CTS (Merck) con el agregado de sulfato de hierro II como preenriquecimiento, e incubándose la mezcla durante 18-24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A su término, 1 ml del caldo fue transferido a 10 ml de caldo tetrionato (Acumedia-Neogen) con solución de yodo, verde brillante y novobiocina e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Luego, el mismo fue sembrado en estrías por agotamiento en los agares XLD (Oxoid) y HE (Acumedia-Neogen).

El resto de los huevos fueron embolsados y dejados a temperatura ambiente durante 13-15 días (H15D). Luego de transcurrido dicho tiempo se repitió el procedimiento antes descrito (**Figura 11**).

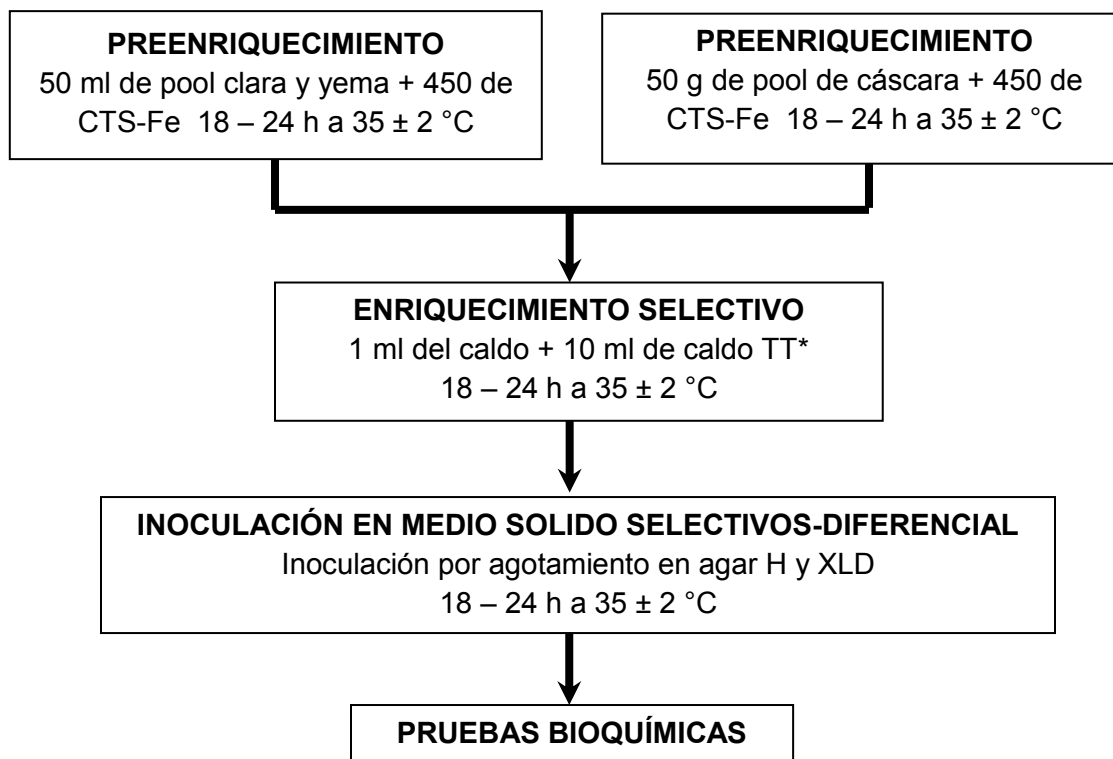


Figura 11. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en huevos

CTS-Fe= caldo tripteaína de soja adicionado con sulfato de hierro II; TT*= caldo tetrionato adicionado con solución iodo-ioduro de potasio, verde brillante y novobiocina; H= Hektoen; XLD= agar xilosa lisina desoxicolato.

2.1.4.6. Hisopado cloacal de aves vivas

A cada pool de 15 hisopos se le agregaron 75 ml de APB (Merck) como preenriquecimiento. Ésta mezcla se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Luego, 1 ml del cultivo se transfirió a 10 ml de caldo tetratonato (Acumedia-Neogen) con solución de yodo, verde brillante y novobiocina e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Por último, se sembró en estrías por agotamiento en placas de agar MC (Acumedia-Neogen) y agar SS (Merck) e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (**Figura 12**).

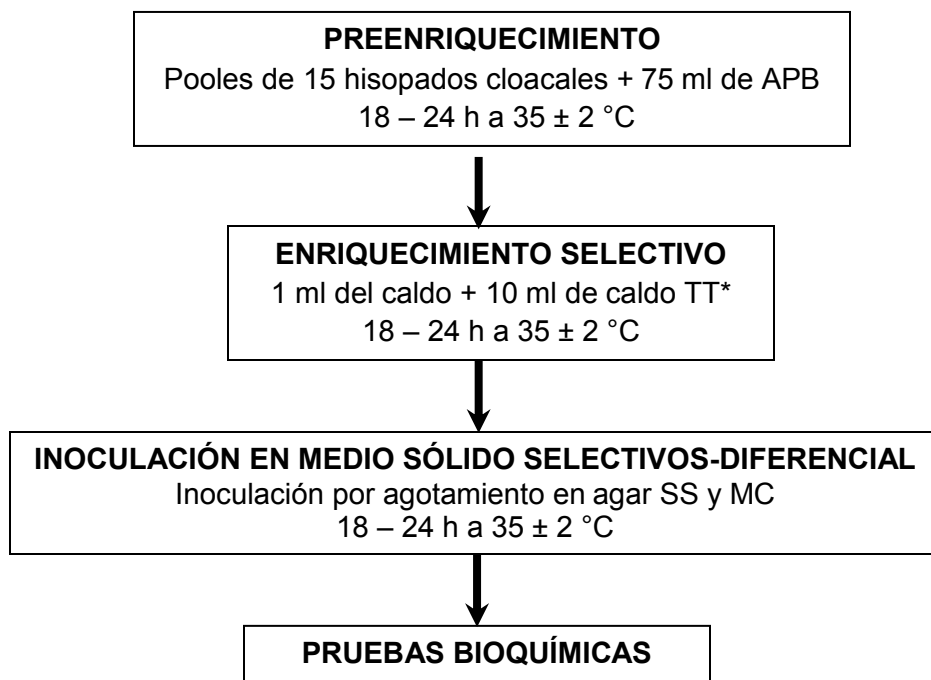


Figura 12. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en pool de hisopados cloacales de aves vivas

APB=agua de peptona bufferada; TT*= caldo tetratonato adicionado con solución iodo-ioduro de potasio, verde brillante y novobiocina; MC= agar MacConkey; SS= agar *Salmonella-Shigella*.

2.1.4.7. Hígados de pollos parrilleros

Los hígados y menudos de pollo congelados se descongelaron en la heladera ($2-8^\circ\text{C}$) durante 18-24 h o a temperatura ambiente ($22-25^\circ\text{C}$) durante 4-5 h antes del análisis. En el caso de los menudos, se separó el hígado del corazón, la molleja y el cuello mediante procedimientos asépticos.

Una vez descongeladas, las muestras fueron analizadas en paralelo por dos técnicas (**Figura 13**). Por un lado, se realizó la inoculación directa en agar MC y agar lisina hierro modificado (MLIA), tocando la cara interna del órgano sobre los agares y

sembradas en estrías por agotamiento, incubándose durante 18-24 h a 35 ± 2 °C. La composición de MLIA (g / l) fue agar lisina hierro 34,5 g (Acumedia-Neogen), sal biliar N° 3 1,5 g (Britania, Buenos Aires, Argentina), lactosa 10 g (Anedra, Holanda), sacarosa 10 g (Biopack, Buenos Aires, Argentina), tiosulfato de sodio 6,76 g (Biopack) y citrato de amonio férrico 0,3 g (Carlo Erba, Milano, Italia). Si no hubo crecimiento bacteriano, las placas fueron entonces reincubadas por un tiempo total de 48 h.

Por otro lado, se pesó individualmente entre 1 y 2 g de cada hígado y se colocó en un tubo de ensayo estéril, en el que posteriormente se agregó como preenriquecimiento agua peptona tamponada (APT; Acumedia-Neogen) en relación 1:10 (peso/volumen) y se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Luego 1 ml del caldo se transfirió a 10 ml de caldo tetratonato con solución de yodo, verde brillante y novobiocina y se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Posteriormente, se sembró por estrías de agotamiento en placas de agar MC y agar MLIA, incubándose a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Si no hubo crecimiento bacteriano, las placas se volvieron a incubar durante un tiempo total de 48 h.

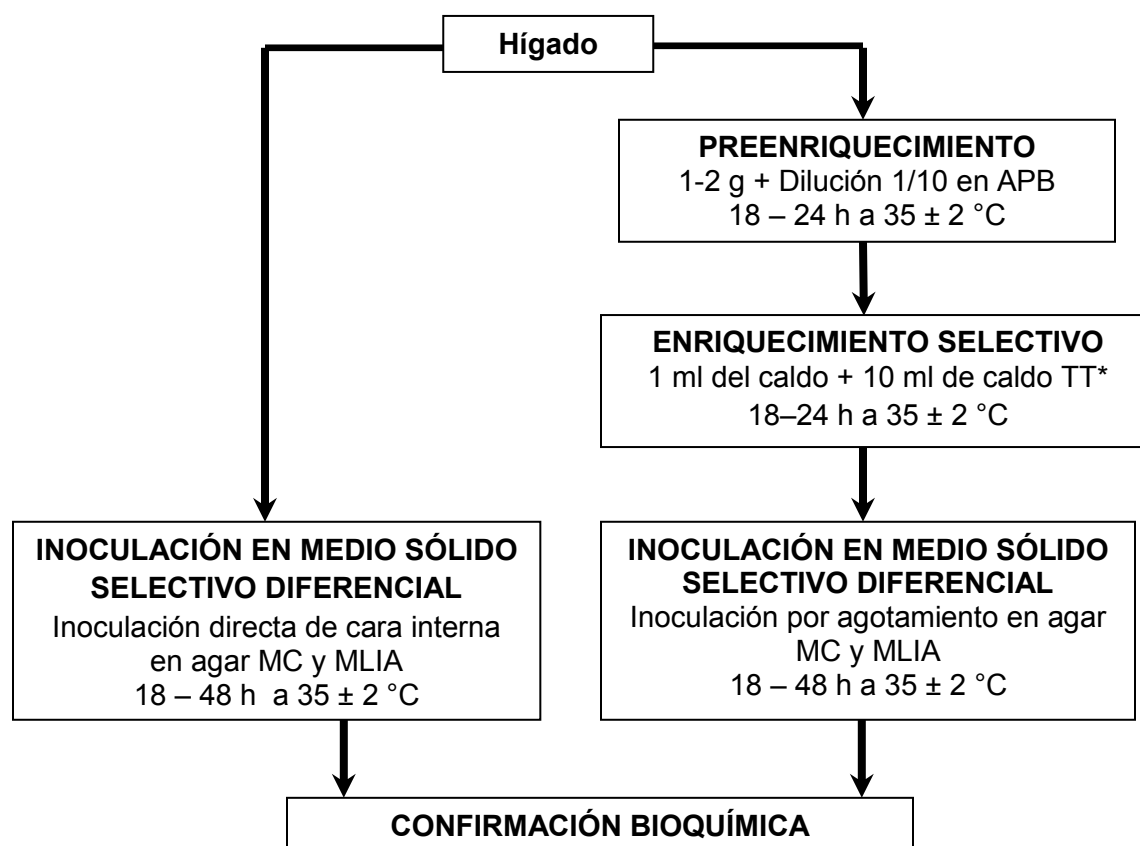


Figura 13. Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* spp. en hígado de pollos parrilleros relacionados a frigoríficos

APB= agua de peptona bufferada; TT*= caldo tetratonato adicionado con solución iodo-ioduro de potasio, verde brillante y novobiocina; MC = agar MacConkey; MLIA = agar lisina hierro modificado.

2.1.5. Identificación de las colonias sospechosas de *Salmonella* spp.

En todos los casos, se tomaron de cada placa de agar selectivo-diferencial al menos dos colonias compatibles con *Salmonella* spp. En caso de no haber colonias bacterianas compatibles con *Salmonella* spp., se tomaron igualmente dos colonias a fin de descartar la presencia de esta bacteria (Andrews *et al.*, 2023). A cada aislamiento se le realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: agar de hierro tres azúcares (del inglés TSI, Britania, Buenos Aires, Argentina), agar lisina hierro (del inglés LIA, Acumedia-Neogen), agar citrato de Simmons (Oxoid, Basingtoke, UK), medio de sulfuro indol movilidad (SIM, Britania), tartrato de Jordan, agar fenilalanina (Hi-Media), orto-nitrofenilgalactopiranosido (O.N.P.G) test (Britania) y agar urea (Britania). Todos los aislamientos de *Salmonella* spp. se conservaron en agar nutritivo (Acumedia-Neogen) hasta su serotipificación. Una granja fue considerada positiva a *Salmonella* spp. cuando esta bacteria se aisló en al menos una de las muestras procesadas. Del mismo modo, una muestra fue considerada positiva cuando esta bacteria se aisló en al menos una de las submuestras procesadas en algunos de los agares selectivos diferenciales.

2.1.6. Serotipificación

La serotipificación de los aislamientos se realizó según el esquema de White-Kauffmann-Le Minor utilizando antígenos somáticos y flagelares (Grimont y Weill, 2007). Para ello, en primer lugar las cepas, que se encontraban guardados en agar nutritivo, fueron cultivadas en placas de agar MC e incubadas a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Posteriormente, se observaron las características y pureza de las colonias en la placa. A partir de allí, se sembraron en agar tripteína de soja (ATS, Acumedia-Neogen) y se incubaron a 35 ± 2 °C, durante 18-24 h. La caracterización del antígeno somático O (AgO) se realizó sobre portaobjetos, mientras que la del antígeno flagelar H (AgH) se realizó en tubos.

Para la serotipificación somática (AgO) se partió del cultivo en ATS, en primera instancia se verificó que el mismo se encuentre en forma lisa suspendiendo las bacterias en solución salina al 0,85 % p/v. Las cepas que correspondieron a colonias lisas (sin autoaglutinación) se colocaron sobre un portaobjeto junto a 20 µl de los antiseros polivalentes OS-A y OS-B (INPB-A.N.L.I.S., Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina). Luego, se mezcló cuidadosamente con palillo durante 2 min para observar presencia o ausencia de aglutinación bajo luz oblicuamente dirigida. En las cepas lisas que mostraron aglutinación positiva para con alguno de los polivalentes somáticos, se continuó su tipificación con los factores flagelares somáticos (INPB-A.N.L.I.S., Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina).

La serotipificación flagelar (AgH) se realizó a partir de un cultivo en caldo, para ello se partió desde el cultivo en ATS se sembró en 5 ml de caldo flagelar (caldo tripteína de soja 15,2 g, triptona 13,3 g, agua destilada c.s.p.1000 ml) y se incubó a 37 °C durante 18-24 h. A partir de este crecimiento se agregaron 5 ml de solución fisiológica formolada al 1

% (Cloruro de sodio 8,5 g, formaldehído al 37-40 % 10 ml, agua destilada c.s.p. 1000 ml), incubando 1 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). En cuatro tubos de ensayo se colocaron 25 µl de los antiseros flagelares polivalentes HS-A, HS-B, HS-C y HS-1 (INPB-A.N.L.I.S., Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina). Luego se agregó 1 ml del caldo formolado incubando durante 1 h a 50 °C en baño de agua. A su término, se observó presencia o ausencia de flóculos bajo luz oblicua. En los aislamientos que fueron positivas a uno o más sueros polivalentes H (expresión de una o dos fases) se continuó la serotipificación con los factores del antígeno flagelar correspondiente (INPB-A.N.L.I.S., Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina). Las cepas que no aglutinaron a los antiseros polivalentes H, pero fueron positivas a la aglutinación somática, fueron tipificadas como *Salmonella* spp. inmóvil.

2.1.7. Confirmación de los aislamientos por reacción en cadena de la polimerasa

2.1.7.1. Extracción de ADN

Las cepas compatibles con *Salmonella* spp, a las pruebas bioquímicas y que estaban conservadas en agar nutritivo, fueron activadas en 5 ml de CTS (Acumedia-Neogen). Posteriormente, se centrifugó a 4.000 x g durante 15 min y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. El pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril. Luego el ADN bacteriano fue liberado de las células por calentamiento durante 10 min a 100 °C en baño seco (Labnet D1 100, Labnet International Inc., Edison, Estados Unidos) y luego centrifugado a 9.300 x g durante 1 min (Bioamerican Science Modelo 724-D, Buenos Aires, Argentina). El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y conservado en freezer a -70 °C hasta su uso.

2.1.7.2. PCR para *Salmonella* spp.

Las extracciones de ADN correspondientes a los aislamientos fueron utilizadas como templados para la amplificación del gen *invA*. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina). Este gen permite la detección de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Malorny *et al.*, 2003). Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl que contenían 0,25 µl de cada primer 0,1 mM (Operon Biotechnologies GmbH, Alemania), 2,5 µl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas), 0,5 µl de cada uno de los dNTP 0,2 mM (Fermentas), 0,2 µl de TaqDNA polimerasa 5 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los primers empleados para este propósito fueron P139 (5'→3: GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA y P141 (5'→3: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron controles positivos (*Salmonella* spp.) y negativos (*Citrobacter* spp.). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95°C en 1 min; 38 ciclos de

amplificación a 95°C en 30 seg, alineamiento a 64°C en 30 seg, extensión a 72°C en 30 seg; extensión final a 72°C en 3 min.

2.1.7.3. PCR para *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis

Las extracciones de ADN correspondientes a los aislamientos fueron utilizadas como templados para la amplificación de fragmentos diferenciales de ADN (*Sdf*, *Salmonella* different fragment), exclusivos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (SE), según Agron *et al.* (2001). La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina). Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía 0,25 µl de cada primer 0,1 mM (Ruralex, Argentina), 2,5 µl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas), 0,5 µl de cada uno de los dNTP 0,2 mM, (Fermentas), 0,125 µl de TaqDNA polimerasa 5 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los primers empleados para este propósito fueron *Sdf* 1 SE 1063 forward (5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3') y *Sdf* 1 SE reverse (5'-CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC-3'). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron controles positivos (SE ATCC 13076) y negativo (*Citrobacter* sp). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95°C en 1 min; 38 ciclos de amplificación a 95°C en 30 seg, alineamiento a 64°C en 30 seg, extensión a 72°C en 30 seg; extensión final a 72°C en 3 min.

2.1.7.4. PCR para *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium

Para la detección de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (ST) se realizó una PCR múltiple para la cual se utilizaron 3 pares de primers. Las extracciones de ADN correspondientes a los aislamientos fueron utilizadas como templados para la amplificación de los genes: *rfbJ* (primers 5'-CCAGCACCAGTTCCAACCTTGATAC y 5'-GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA); *fliC* C (5'-ATAGCCATCTTTACCAGTTCCCCC y 5'-GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC) y *fliB* (primers 5'-ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC y 5'-TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG), cuyos fragmentos tienen un tamaño de 663, 183 y 526 pb, respectivamente. Esta reacción permite la identificación de ST, de acuerdo a Lim *et al.* (2003). La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina). Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl, que contenía 0,25 µl de cada primer 0,1 mM (Ruralex, Argentina), 2,5 µl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas), 0,5 µl de cada uno de los dNTP 0,2 mM, (Fermentas), 0,125 µl de TaqDNA polimerasa 1 U/µl (Fermentas), y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN y se incluyeron controles positivo (ST 06/11) y negativo (*Citrobacter* sp.). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial

a 95°C en 3 min; 30 ciclos de amplificación a 95°C en 1 min., alineamiento a 65°C en 1 min, extensión a 72°C en 30 seg; extensión final a 72°C en 1 min.

2.1.7.5. Visualización de los fragmentos de ADN amplificados

Todos los productos de amplificación fueron sembrados en gel de agarosa para realizar la migración del amplicón mediante electroforesis. Un volumen de 10 µl de cada amplicón y el marcador de pares de bases se sembró en agarosa al 2 % (BioRad, España) en buffer TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA), y se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los productos de amplificación (~284 pb para gen *invA*, ~293 pb para SE y para ST ~663pb para el primer par, ~183pb para el segundo y ~526 pb para el tercero) fueron visualizados con un transiluminador UV (UltraBright UV Transiluminator, MBL-21, Maestrogen). El marcador de pb usado contenía bandas de ADN entre 100 y 2080 pb (PB-L Products Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina).

2.1.8. Estudios de capacidad discriminatoria y concordancia

Para la realización de los estudios de capacidad discriminatoria y concordancia se siguieron las fórmulas del punto 2.1.6 del capítulo 1 de este trabajo de tesis. Dado que se buscaba contaminación natural, los parámetros calculados eran relativos. De esta manera, para los medios de cultivos selectivos-diferenciales o técnicas de cultivo se calcularon la exactitud (ExaR), sensibilidad (SenR), especificidad (ESPR), valor predictivo positivo (VPPR) y valor predictivo negativo (VPPR) relativos. Una muestra positiva en al menos uno de los medios selectivos-diferenciales utilizados se consideró positiva. La concordancia entre los medios de cultivos selectivos-diferenciales y/o técnicas fueron calculados según el punto 2.1.7 del capítulo 1.

2.1.9. Identificación de factores de riesgo

La estimación de los factores de riesgo se realizó en las granjas muestreadas, para ello se diseñó un cuestionario con la idea de obtener información para conocer las prácticas de manejo en los establecimientos encuestados y su posible relación con la presencia de *Salmonella* spp. en las granjas. Esta información fue recogida el día del muestreo y los datos fueron analizados en conjunto con los resultados obtenidos de los análisis de laboratorio.

2.1.9.1. Diseño del cuestionario

La encuesta se basó en las medidas de bioseguridad dispuestas para los establecimientos avícolas según la reglamentación de SENASA 542/2010 (SENASA, 2010). Para la realización de las preguntas, se siguió lo propuesto por Díaz de Rada

(2001) y Thrusfield (1990). Las preguntas fueron generales y específicas, abiertas y cerradas y utilizando terminología sencilla. La encuesta se realizó personalmente el día del muestreo, efectuándose al propietario de la granja, o en su ausencia, al encargado del establecimiento. Al finalizar la entrevista se entregó al entrevistado una tarjeta de agradecimiento firmada por el entrevistador. La encuesta abordó, entre otros puntos, conocimiento de reglamentaciones avícolas, la línea genética de las aves, edad, plan sanitario, control de roedores, coexistencia de otros animales en la granja, antecedentes de enfermedades, características del alimento, abastecimiento de agua, datos del galpón. En el **Anexo 1** y el **Anexo 2** se pueden ver las encuestas realizadas.

2.1.9.2. Procesado de los datos y análisis estadístico

Las respuestas obtenidas a partir de las encuestas fueron codificadas en una planilla de Excel (Microsoft). Para cuantificar el riesgo asociado con la presencia de *Salmonella* spp. en las granjas se realizó un análisis estadístico de dos etapas, tomando como unidad de estudio cada galpón muestreado. En la primera etapa, en la cual se determinaron posibles factores asociados, todas las variables incluidas en la encuesta fueron comparadas con el resultado del aislamiento de *Salmonella* spp. utilizando tablas de contingencia y mediante la prueba estadística de asociación χ^2 ó el test de Fisher. Esto último fue realizado en aquellos casos en los que una de las celdas de la tabla de contingencia tuviera un valor entre 1 y 5.

Las variables cuantitativas y las cualitativas con varios niveles fueron categorizadas a dos niveles. Una vez ordenados los datos, se procedió al análisis mediante χ^2 o el test de Fisher y las variables se consideraron significativas con un valor de $p < 0,15$. Dichas variables fueron seleccionadas para la segunda etapa del análisis. Este último consistió en la aplicación de una regresión logística, en la cual se incluyeron todas las variables estadísticamente significativas obtenidas en el análisis previo (Hosmer y Lemeshow, 2004). El método de estimación fue el de las probabilidades máximas ("maximum likelihood") con un criterio de convergencia de 0,01 para un máximo de 10 iteraciones. En esta segunda etapa del análisis, las variables se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$. La probabilidad de riesgo se interpretó a través de la razón o cociente de probabilidades (OR, por sus siglas en inglés Odds ratio). Las variables que no resultaron significativas aplicando el modelo de regresión logística fueron comparadas aplicando el test de χ^2 a fin de establecer una asociación entre ellas.

3. RESULTADOS

3.1. AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP.

3.1.1. Granja de gallinas de postura

Teniendo en cuenta el criterio de muestreo, en 14 oportunidades se muestrearon 2 galpones/granja, dando un total de 77 galpones muestreados. Considerando una granja como positiva al aislamiento de *Salmonella* spp., en al menos uno de los tipos de muestras, la prevalencia encontrada fue del 46 % (29 granjas positivas a *Salmonella* spp. sobre un total de 63 granjas). De las granjas positivas en el 38 % (11 de 29) se aisló *Salmonella* spp. en dos muestras diferentes. Considerando el estudio por departamentos y según el número total de granjas muestreadas, la prevalencia de esta bacteria fue de 53 % (27 de 51) para Paraná y de 17 % (2 de 12) para Diamante. Por otro lado, el 42 % (32 de 77) de los galpones muestreados fueron positivos a *Salmonella* spp. en algún tipo de muestra.

En total se procesaron 1.807 muestras, dando positivas para el aislamiento de *Salmonella* spp. sólo el 5 % (93) de las mismas (**Tabla 26**). En base al tipo de muestra, el porcentaje de granjas, galpones y muestras positivas estuvo entre 2 % y 25 %, 1 % y 25 %, y 0,6 % a 19 %, respectivamente, siendo los menores y mayores valores para hisopado cloacal de aves vivas y guano, respectivamente. Pese a haberse muestreado menores cantidades de aves muertas que vivas, el número de muestras positivas a *Salmonella* spp. fue mayor en las primeras. Para el caso de las muestras de huevos que fueron analizadas inmediatamente se encontró que el 6 % (4 de 63) de las granjas fueron positivas para *Salmonella* spp. y el 5 % (4 de 77) de los galpones fue aislada esta bacteria. No se aisló *Salmonella* spp. de ninguno de los 231 pooles de clara y yema, mientras que 5 de 231 (2 %) pooles de cáscara resultaron positivos. Y para el caso de las muestras de huevos que fueron analizadas luego de 15 días se encontró que tanto para las granjas como para los galpones la prevalencia fue del 3 %, 2 de 63 y 2 de 77 respectivamente. En este caso se aisló *Salmonella* spp. de los pooles de clara y yema en 3 oportunidades (1 %), de los cuales dos correspondían a un mismo galpón; el mismo porcentaje de aislamiento se obtuvo para los pooles de cáscara (2 de 231). En ningún caso se aisló *Salmonella* spp. de los mismos galpones de las muestras analizadas inmediatamente y a los 15 días. Con respecto a las muestras de aves muertas, en 29 granjas no se encontró dicha muestra, debido a que las mismas ya habían sido eliminadas o simplemente no hubo mortandad el día del muestreo. Del mismo modo de los 77 galpones muestreados en 37 no se hallaron aves muertas. Considerando solamente en donde se encontró al menos un ave muerta el porcentaje de aislamiento de *Salmonella* spp. en algún tipo de muestra fue de 15 % (5 de 34) y 13 % (5 de 40) para granjas y galpones, respectivamente. En total se analizaron 110 aves muertas, de las cuales el porcentaje de aislamiento para la inoculación directa de hígados y bazo fue de 9 % y 8 % respectivamente. La prevalencia encontrada para estos dos tipos de muestras por granja y galpones en las cuales se encontró al menos un ave muerta fue del 12 % (4

de 34) y 10 % (4 de 40) para ambos tipos de muestras, respectivamente. En pooles realizados con los hígados y bazos y en los pooles de ciegos se encontró un porcentaje de aislamiento del 15 % (5 de 34) por granja y del 13 % (5 de 40) por galpón estudiado. Los 4 galpones positivos para la inoculación directa de hígados y los 3 positivos para bazos también resultaron positivos para ambos pooles. Mientras que solo 2 galpones resultaron positivos para el aislamiento de *Salmonella* spp. para las muestras de hisopados cloacales de aves muertas, estos mismos galpones fueron positivos para los pooles de los órganos.

Tabla 26. Porcentaje de aislamiento de *Salmonella* spp. en los diferentes tipos de muestras analizadas en galpones de gallinas de postura

Tipo de muestra	Porcentaje de aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. (N° positivo/N° total analizado)		
	Granja	Galpón	Muestra individual
Guano	25 (16/63)	25 (19/77)	19 (29/154)
Alimento	17 (11/63)	18 (14/77)	10 (23/231)
Huevo	6 (4/63)	5 (4/77)	1 (5/462)
Huevo 15 días incubación	3 (2/63)	3 (2/77)	1 (5/462)
Pool hisopado cloacal aves vivas	2 (2/63)	1 (1/77)	0,6 (1/154)
Hígado ¹	12 (4/34)	10 (4/40)	9 (10/110)
Bazo ¹	12 (4/34)	10 (4/40)	8 (9/110)
Pool hígado-bazo¹	15 (5/34)	13 (5/40)	13 (5/40)
Pool de ciegos¹	15 (5/34)	13 (5/40)	13 (5/40)
Pool hisopado cloacal aves muertas¹	6 (2/34)	5 (2/40)	5 (2/44)
Todas las muestras	46 (29/63)	42 (32/77)	5 (93/1807)

¹Se consideraron solamente las granjas y/o galpones donde se encontró al menos un ave muerta.

3.1.2. Granja de pollos parrilleros

Teniendo en cuenta el criterio de muestreo establecido para las muestras de alimento balanceado y aves muertas, en 12 oportunidades fueron muestreados 2 galpones por granja, dando así un total de 105 galpones. Por otro lado, en 83 granjas se tomaron muestras de cama de dos galpones, dando un total de 176 galpones muestreados. Considerando una granja como positiva al aislamiento de *Salmonella* spp. en al menos uno de los tipos de muestras (**Tabla 27**), la prevalencia encontrada fue del 62 % (58 granjas positivas a *Salmonella* spp. sobre un total de 93 granjas). De las granjas positivas en el 45 % (26 de 58) se aisló *Salmonella* spp. en dos tipos de muestras diferentes. A su vez, sobre un total de 1.093 muestras analizadas para aislamiento de *Salmonella* spp., sólo el 11 % de las mismas (123) fueron positivas a esta bacteria. Teniendo en cuenta cada departamento muestreado individualmente se obtuvo que el porcentaje de granjas positivas para Uruguay es de 55 % (26 de 47), Colón de 68 % (21 de 31) y Gualeguaychú de 73 % (11 de 15).

Teniendo en cuentas individualmente los diferentes tipos de muestras, se obtuvo para el caso de hisopados de cama que el 52 % (48 de 93) de las granjas fueron positivas para *Salmonella* spp. Mientras que de los 178 galpones analizados, 64 muestras fueron positivas a *Salmonella* spp. en ese tipo de muestra (36 %). Para el caso de las muestras de alimentos balanceado que consumen las aves, se encontró que en el 30 % (28 de 93) de las granjas se aisló *Salmonella* spp. y se obtuvo el mismo porcentaje de aislamiento considerando los galpones muestreados (32 de 105). Sin embargo, la tasa de aislamiento considerando individualmente las muestras de alimento fue del 15 % (46 de 315). En lo que respecta a las muestras de aves muertas, en 34 de las 93 granjas visitadas no se encontraron aves muertas, debido a que las mismas ya habían sido eliminadas o simplemente no hubo mortandad el día del muestreo. Del mismo modo, de los 105 galpones visitados en 41 no se hallaron aves muertas. Si se considera en donde se encontró al menos un ave muerta, el porcentaje de aislamiento de *Salmonella* spp., en algún tipo de muestra tomada de las aves muertas, fue de 7 % (4 de 59) y 6 % (4 de 64) para granjas y galpones, respectivamente. En total se analizaron 202 aves muertas, de las cuales el porcentaje de aislamiento para la inoculación directa de hígados y bazo fue de 1 % en ambos casos. Mientras que la prevalencia encontrada para estos dos tipos de muestras por granja en las cuales se encontró al menos un ave muerta fue del 2 % (1 de 59) para ambos tipos de muestra. Así también el porcentaje de aislamiento por galpón fue del 2 % (1 de 64) para ambas muestras. En pooles realizados con los hígados y bazos y en los pooles de ciegos se encontró un porcentaje de aislamiento del 3 % (2 de 59) por granja y del 3 % (2 de 64) por galpón estudiado para ambos casos. Solo un galpón resultó positivo para la inoculación directa de hígados y bazos, este mismo galpón también resultó positivo para los pooles de hígado-bazo y pooles de ciegos. Por otro lado, 3 pooles de hisopados cloacales de aves muertas resultaron positivos para el aislamiento de *Salmonella* spp. Uno de ellos coincidió con el aislamiento en muestras de pooles de hígado- bazo y pooles de ciegos. Mientras que los otros dos pooles de hisopados cloacales positivos fueron las únicas muestras positivas para el aislamiento de *Salmonella*

spp. en aves muertas. De esta forma el porcentaje de aislamiento para este tipo de muestra fue del 5 % (3 de 59) por granja y de 5 % (3 de 64) por galpón analizado.

Tabla 27. Porcentaje de aislamiento de *Salmonella* spp. en los diferentes tipos de muestras analizadas en galpones de pollos parrilleros

Tipo de muestra	Porcentaje de aislamiento		
	Granja (N° granjas positivas/N° total de granjas)	Galpón (N° galpones positivos/N° total de galpones)	Muestra (N° muestras positivas/N° total de muestras)
Hisopado de cama	52 (48/93)	36 (64/176)	36 (64/176)
Alimento	30 (28/93)	30 (32/105)	15 (46/315)
Aves muertas ¹ (total sub-muestras)	7 (4/59)	6 (4/64)	2 (13/602)
Hígado ¹	2 (1/59)	2 (1/64)	1 (3/202)
Bazo ¹	2 (1/59)	2 (1/64)	1 (3/202)
Pool hígado-bazo ¹	3 (2/59)	3 (2/64)	3 (2/64)
Pool de ciegos ¹	3 (2/59)	3 (2/64)	3 (2/64)
Pool hisopados cloacales ¹	5 (3/59)	5 (3/64)	4 (3/70)
Todas las muestras	62 (58/93)	45 (80/176)	11 (123/1093)

¹Se consideraron solamente las granjas y/o galpones donde se encontró al menos un ave muerta.

3.1.3. Hígados de pollos parrilleros para consumo

Se tomaron un total de 666 muestras de hígados, correspondientes a 74 muestras de hígados de pollos parrilleros de cada uno de los 9 frigoríficos ubicados en la zona de mayor densidad de granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos. Treinta dos muestras (4,8 %) fueron positivas al aislamiento de *Salmonella* spp. por alguna de las dos técnicas de cultivo utilizadas. De los 9 frigoríficos solo se encontraron muestras positivas en 4 de ellos. De un frigorífico se encontraron 24 muestras positivas a *Salmonella* spp, mientras que en otro 6 muestras fueron positivas y en los dos restantes solamente se pudo aislar *Salmonella* spp. de una sola muestra (**Tabla 28**).

Tabla 28. Muestras positivas al aislamiento de *Salmonella* spp. en hígado de pollo obtenidas de mercados relacionados con nueve frigoríficos de pollos en Entre Ríos

Frigorífico de aves	Numero de muestras	% positivos a <i>Salmonella</i> spp. (número de positivos)
A	74	0 (0)
B	74	1,4 (1)
C	74	0 (0)
D	74	1,4 (1)
E	74	0 (0)
F	74	0 (0)
G	74	0 (0)
H	74	8,1 (6)
I	74	32,4 (24)
TOTAL	666	4,8 (32)

3.1.4. Confirmación bioquímica e identificación de *Salmonella* spp.

Todas las cepas de *Salmonella* spp. aisladas mostraron características típicas a las pruebas bioquímicas ensayadas, de este modo resultaron fermentadoras de glucosa, pero no fermentadoras de lactosa y sacarosa (TSI), mostraron actividad enzimática para descarboxilar la lisina (LIA). Todas las cepas resultaron negativas a la prueba de indol, y positivas a la prueba de producción de sulfuro de hidrógeno (SIM, TSI, LIA). A su vez, la prueba SIM permitió diferenciar los serovares móviles de los inmóviles, los serovares móviles utilizaron el citrato como única fuente de carbono, mientras que los serovares inmóviles no utilizaron el citrato como fuente de carbono (CIT), ninguna cepa mostró actividad enzimática de β -galactosidasa, fenilalanina-desaminasa y ureasa (ONPG, FA y U) y todas las cepas utilizaron el tartrato de sodio y potasio (TJ).

De todos los medios selectivos diferenciales en donde se aisló una o más *Salmonella* spp. se escogió un aislamiento para ser conservado para los estudios posteriores. De este modo se obtuvieron un total de 543 cepas de *Salmonella* spp., correspondiente 259; 234 y 50 aisladas en galpones de pollos parrilleros, gallinas de postura e hígado de pollo parrilleros de venta en supermercado, respectivamente.

3.1.5. Serotipificación de los aislamientos de *Salmonella* spp.

3.1.5.1. Granja de gallinas de postura

En la **Tabla 29** se observan los resultados de la serotipificación para los 234 aislamientos obtenidos a partir de las distintas muestras de granjas de gallinas ponedoras. Fueron identificados 64 aislamientos como SE y 2 como ST. Las primeras fueron aisladas de todos los tipos de muestras analizadas a excepción de las muestras de alimentos y ST

fue aislada de muestras de guano. Por otro lado, de las 36 cepas aisladas identificadas como *Salmonella* spp. del tipo inmóvil fueron serotipificadas como SG, y fueron aisladas de los órganos de los animales y de los pooles de clara y yema. El resto de las cepas fueron serotipificadas en 11 serotipos diferentes, mientras que 3 cepas no pudieron ser serotipificadas.

Tabla 29. Porcentaje de los diferentes serotipos de *Salmonella* spp. aislados en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos

Serotipos de <i>Salmonella</i> spp.	N° de aislamientos	% en función de las cepas aisladas	N° de muestras positivas (%)
Enteritidis	64	27,4	10
Westhampton	45	19,2	6
Gallinarum	36	15,4	4
Livingstone	20	8,5	4
Tennessee	15	6,4	4
Cerro	12	5,1	7
Infantis	10	4,3	4
Anatum	8	3,4	2
Muenster	8	3,4	2
Amsterdam	4	1,7	1
Nyborg	4	1,7	1
Norton	2	0,9	1
Typhimurium	2	0,9	1
Brezany	1	0,4	1
No tipificada (Autoaglutina)	3	1,3	2
Total	234	100	50

De las 29 granjas positivas al aislamiento de *Salmonella* spp. en 9 de ellas se aislaron más de un serotipo de *Salmonella* spp. y en 6 granjas se aisló el mismo serotipo en dos diferentes muestras pertenecientes a la misma granja. En la **Tabla 30** se indica que en las granjas positivas solo se aislaron SG y SE en muestras de aves, tanto vivas como muertas. Mientras que en las muestras de alimento y guano se encontraron 11 serotipos diferentes, y el alimento fue el único tipo de muestras en donde no se aisló SE.

Tabla 30. Serotipos aislados en los diferentes tipos de muestras en granjas gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos

Granja	N° de serotipos aislados	Serotipo aislado por tipo de muestra (cantidad de cepas aisladas para el tipo de muestra)				
		Guano	Alimento	Aves muertas	Huevo	Hisopado cloacal aves vivas
2	1			Gallinarum (10)		
3	1			Gallinarum (2)		
5	1				Enteritidis (2)	
6	1				Enteritidis (7)	
7	2	Tennessee (2); Cerro (4)			Cerro (1)	
8	3	Livingstone (8); Tennessee (1); Cerro (1)				
9	2		Cerro (1)		Gallinarum (1)	
10	2	Enteritidis (2)			Cerro (1)	
12	3	Infantis (4); Enteritidis (3) ; Cerro (2)				
14	3	Anatum (6); Infantis (2)	Livingstone (2)			
17	1	Enteritidis (8)		Enteritidis (8)		
19	1		Norton (2)			
20	1				Enteritidis (2)	
23	1		Anatum (2)			
25	1	Enteritidis (4)		Enteritidis (18)		
28	3	Westhampton (5); Brezany (1)	Westhampton (2)			Enteritidis (2)
42	1		Westhampton (2)			
45	1	Livingstone (7)				
47	3	Tennessee (10); Muenster (2)	Cerro (2); Tennessee (2)			
48	1	Westhampton (16)	Westhampton (18)			
49	1	Typhimurium (2)				
51	1	Enteritidis (8)				
52	1	Infantis (2)				
57	1		Infantis (2)			
59	1		Amsterdam (4)			
60	1			Gallinarum (22)		
61	1		Livingstone (4)			
62	2	No Tipificado (1)	Nyborg (4); Westhampton (2)			
63	1	No Tipificado (2)	Muenster (6)			

3.1.5.2. Granja de pollos parrilleros

En la **Tabla 31** se observan los resultados de la serotipificación para los aislamientos obtenidos a partir de las distintas muestras de los galpones de pollos parrilleros. Treinta aislamientos fueron SE y 10 ST. Por otro lado, de las 14 cepas aisladas identificadas como *Salmonella* spp. del tipo inmóvil fueron serotipificadas como SG y fueron aisladas de los órganos de los animales. El resto de las cepas fueron serotipificadas en 28 serotipos diferentes, mientras que 2 cepas autoaglutinaron y por lo tanto no pudieron ser serotipificadas por el procedimiento anteriormente descrito.

De las 58 granjas de pollos parrilleros positivas al aislamiento de *Salmonella* spp., en 22 de ellas se aislaron más de un serotipo de este género. En sólo 5 granjas se encontró el mismo serotipo en dos muestras diferentes. En la **Tabla 32** se muestran los serotipos aislados por cada tipo de muestra en las granjas positivas, en donde se puede ver que en las muestras de aves muertas se encontraron cuatro serotipos diferentes: Gallinarum, Enteritidis, Agona y Schwarzengrund. En este tipo de muestra fue en el único en donde se aisló SG. Mientras que en las muestras de alimento se encontraron 18 serotipos diferentes: Livingstone, Vejle, Sarajane, Westhampton, Muenster, Anatum, Mbandaka, Montevideo, Agona, Rissen, Bredeney, Kingston, Schwarzengrund, Tennessee, Stanley, Brezany, Mons y S.I 1,4,12:d:NT. Se encontraron 24 serotipos diferentes en muestras de hisopado de cama: Clackamas, Typhimurium (solo fue aislada en este tipo de muestra), Heidelberg, Corvallis, S.I O(R):b:e,n,x, Suberu, Derby, Bredeney, Sarajane, Eko, Agona, Tennessee, Enteritidis, Duisburg, Schwarzengrund, Anatum, Stanley, Rissen, Westhampton, Newport, Mbandaka, Livingstone, Mons y Amersfoort.

Tabla 31. Porcentaje de los diferentes serovares de *Salmonella* spp. aislados en granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos

Serotipos de <i>Salmonella</i> spp.	N° de aislamientos	% en función de las cepas aisladas	N° de muestras positivas
Enteritidis	30	11,6	16
Anatum	26	10,0	14
Tennessee	22	8,5	11
Schwarzengrund	18	6,9	9
Rissen	16	6,2	9
Gallinarum	14	5,4	8
Livingstone	13	5,0	7
Westhampton	13	5,0	6
Muenster	12	4,6	5
Sarajane	12	4,6	7
Typhimurium	10	3,9	6
Derby	9	3,5	4
Agona	8	3,1	6
Mbandaka	7	2,7	4
Bredeney	6	2,3	3
Stanley	5	1,9	3
Mons	4	1,5	2
Corvallis	3	1,2	1
Eko	3	1,2	2
Suberu	3	1,2	2
Vejle	3	1,2	1
Brezany	2	0,8	1
Duisburg	2	0,8	1
Kingston	2	0,8	1
Montevideo	2	0,8	2
Newport	2	0,8	1
Amersfoort	1	0,4	1
Clackamas	1	0,4	1
Heidelberg	1	0,4	1
S.I 1,4,12:d:NT	6	2,3	2
S.I O(R):b:e,n,x	1	0,4	1
No tipificada (Autoaglutina)	2	0,8	1
Total	259	100,0	139

Tabla 32. Serovares aislados en los diferentes tipos de muestras en granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos

Granja	Numero de serotipos aislados	Serotipo aislado por tipo de muestra (cantidad de cepas aisladas para el tipo de muestra)		
		Hisopado de cama	Alimento	Aves muertas
3	3	Clackamas (1) Typhimurium (2) Heidelberg (1)		
5	1		Livingstone (1)	
6	2	Corvallis (3) S.I O(R):b:e,n,x (1)		
8	1	Suberu (2)		
10	1		Vejle (3)	
11	1	Derby (3)		
14	1	Bredeney (2)		
16	1	Sarajane (2)	S.I 1,4,12:d:NT (6)	
18	5	Typhimurium (4) Derby (2) Eko (1)	Sarajane (2)	Agona (1)
19	1		Westhampton (4)	
20	5	Agona (1) Tennessee (1) Typhimurium (1)	Westhampton (3) Muenster (1)	
23	1	Enteritidis (4)		
24	1	Duisburg (2)		
26	1			Schwarzengrund (1)
27	6	Schwarzengrund (2)	Sarajane (2) Anatum (2) Mbandaka (2) Montevideo(1)	Gallinarum (14)
28	5	Enteritidis (3) Anatum (2)	Muenster (2) Anatum (2) Livingstone (2)	Enteritidis (3) Suberu (1)
30	3		Muenster (9) Montevideo (1) Agona (2)	
32	2	Anatum (3) Stanley (1)		
34	3	Schwarzengrund (2) Eko(2)	Rissen (1)	
36	1	Sarajane (2)		
38	1	Schwarzengrund (2)		
43	1	Bredeney (2)	Bredeney (2)	
48	1	Enteritidis (2)		
49	1		Kingston(2)	
50	1		Schwarzengrund (4)	
51	1	Typhimurium (2)		
53	1	Rissen (2)		
54	1	Rissen (2)		
55	2	Schwarzengrund (4)	Anatum (2) Schwarzengrund(1)	

Continuación de la Tabla 32.

56	1	Derby (2)	
60	1	Westhampton (4)	
61	2	Sarajane (2) Enteritidis(2)	NT (2) ¹
62	1	Enteritidis(2)	
63	1	Derby (2)	
64	2	Anatum (2)	Tennessee (11)
65	1	Stanley (2)	
69	1	Anatum (4)	
71	1	Typhimurium (1)	
72	1	Newport (2)	
73	1	Enteritidis(4)	
74	1	Enteritidis(2)	
75	1	Westhampton (2)	
76	1	Mbandaka (2)	
78	1		Tennessee (3)
79	1		Tennessee (2)
80	2	Enteritidis (2)	Tennessee (1)
81	1	Livingstone (4)	
82	1	Schwarzengrund (2)	
83	1	Mons (2)	
84	2	Enteritidis (2)	Mbandaka (1)
85	2	Enteritidis (1)	Agona (2)
86	2		Rissen (10) Stanley (2)
88	4	Livingstone (2) Tennessee (1) Enteritidis (1)	Tennessee (3) Sarajane (1)
89	3	Mbandaka (2) Anatum (2)	Sarajane (1)
90	2	Livingstone (4)	Brezany (2)
91	2	Enteritidis (2)	Agona (2)
92	2	Anatum (1) Rissen (1)	Anatum (4)
93	3	Amersfoort (1) Anatum (2)	Mons (2)

¹ NT= no tipificado

3.1.5.3. Hígados de pollos parrilleros para consumo

En la **Tabla 33** se observan los resultados de la serotipificación para los 50 aislamientos obtenidos a partir de las distintas muestras. Pudieron serotipificarse 9 (18 %) aislamientos como SE y 2 (4 %) como ST. El resto de las cepas fueron serotipificadas como S. ser. Schwazengrund (78 %). Se encontró más de un serovar de *Salmonella* spp. en hígados de dos frigoríficos de pollos, mientras que solo se encontró un serovar en hígados de los otros dos frigoríficos. Teniendo en cuenta los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Schwazengrund se obtuvieron porcentajes de aislamiento en muestras individuales de 0,75, 0,15 y 3,90 %, respectivamente. ST solo se pudo aislar de una sola muestra proveniente de un solo frigorífico, mientras que SE se pudo aislar de 5 muestras proveniente de 3 frigoríficos diferentes. Por su parte, S. ser. Schwazengrund se aisló de 26 muestras provenientes de dos frigoríficos diferentes.

Tabla 33. Serotipos de *Salmonella* spp. aislados en muestras de hígados de pollos parrilleros obtenidos de mercados relacionados con cuatro frigoríficos de pollos parrilleros (B, D, H, I) en la provincia de Entre Ríos

Frigorífico de aves	Nº de serovares aislados	Serovares aislados (Nº de muestras positivas)
B	1	Enteritidis (1)
D	1	Typhimurium (1)
H	2	Schwazengrund (4), Enteritidis (2)
I	2	Schwazengrund (22), Enteritidis (2)
Total	3	Schwazengrund (26), Enteritidis (5), Typhimurium (1)

3.1.5. Confirmación de *Salmonella* spp. por PCR

Todas las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas resultaron positivas a la amplificación por PCR a nivel de género. Además, se pudieron confirmar 103 cepas como SE (30, 64 y 9 cepas aisladas de granjas de pollos parrilleros, gallinas de postura e hígado de pollos parrilleros para consumo, respectivamente) y 14 como ST, debido a la amplificación de los genes diferenciales para cada serovar (10, 2 y 2 cepas aisladas de granjas de pollos parrilleros, gallinas de postura e hígado de pollos parrilleros para consumo, respectivamente). Estos coincidieron con los datos de serotipificación de estos serovares.

3.1.6. Prevalencia de *Salmonella* ser. Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum en las granjas

3.1.6.1. Granjas de gallina de postura

En la **Tabla 34** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la prevalencia de *Salmonella* de los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum para cada tipo de muestra analizada. Teniendo en cuenta todas las muestras analizadas, el porcentaje de aislamiento por granja fue de 14, 2 y 6 % para los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum, respectivamente. No se aislaron estos serotipos en la misma granja, sólo el serotipo Enteritidis fue aislado conjuntamente con otro serotipo de *Salmonella* spp.

Teniendo en cuenta las muestras de guano se obtuvo un porcentaje de aislamiento para SE de 8, 6 y 5 % para granjas, galpones y muestras individuales respectivamente. Mientras que para ST se obtuvo porcentajes de 2, 1 y 1 % para granjas y galpones y muestras individuales respectivamente. Es este el único tipo de muestra en el cual se logró aislar ST. No se obtuvieron aislamientos de SG para este tipo de muestra así como tampoco se encontraron aislamientos de estos tres serotipos para las muestras de alimento.

Con respecto a las muestras de huevo, se aisló solamente SG en las muestras de H15D, obteniéndose porcentajes de 2, 1 y 0,2 % para granjas, galpones y muestras individuales respectivamente. Mientras que SE fue aislada tanto en huevo fresco como en H15D, con porcentajes de 0,4 % para muestras individuales en ambos casos, mientras que para granjas se obtuvieron porcentajes de 3 y 2 % para huevo fresco y H15D, respectivamente. Considerando los galpones muestreados, se obtuvieron porcentajes de 3 y 1 % para huevo y H15D, respectivamente. Por otro lado, solo se aisló SE en una muestra de pooles de hisopados cloacales de aves vivas, resultando así porcentajes de aislamiento para granjas, galpones y muestras individuales de 2, 1 y 0,6 %, respectivamente.

No se pudo aislar ST en ningún tipo de muestras proveniente de las aves muertas. Mientras que el 6, 5 y 4 % de las granjas, galpones y muestras individuales fueron positivos en las inoculaciones directas de hígados y bazo para SE, respectivamente. A su vez, se encontró un valor similar en porcentaje de aislamiento de SG para granjas, galpones y muestras individuales. Por otro lado, en los pooles realizados con los órganos, se encontró iguales valores para los pooles de hígado-bazo y de ciegos para el caso de SE con porcentajes de 6, 5 y 5 % para granjas, galpones y muestras individuales, respectivamente. Mientras que para el caso de SG, los resultados obtenidos para ambos pooles fueron diferentes, encontrando valores superiores en pooles de hígado-bazo; con porcentajes de 9, 8, y 8 % para granjas y galpones y muestras individuales, respectivamente. Para las muestras de hisopados cloacales de aves muertas, se encontraron los mismos valores para SE y SG, con tasa de aislamiento de 3, 3 y 2 % para granjas, galpones y pooles realizados, respectivamente.

Tabla 34. Aislamiento de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), S. ser. Typhimurium (ST) y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) en los diferentes tipos de muestras analizadas en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos

Tipo de muestra	% positivos (N° positivos/ N° analizado)								
	SE			ST			SG		
	Granja	Galpón	Muestra individual	Granja	Galpón	Muestra individual	Granja	Galpón	Muestra individual
Guano	8 (5/63)	6 (5/77)	5 (7/154)	2 (1/63)	1 (1/77)	1 (1/154)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/154)
Alimento	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/231)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/231)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/231)
Huevo	3 (2/63)	3 (2/77)	0,4 (2/462)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/462)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/462)
Huevo 15	2 (1/63)	1 (1/77)	0,4 (2/462)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/462)	2 (1/63)	1 (1/77)	0,2 (1/462)
Hisopado cloacal aves vivas	2 (1/63)	1 (1/77)	0,6 (1/154)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/154)	0 (0/63)	0 (0/77)	0 (0/154)
Hígado ¹	6 (2/34)	5 (2/40)	4 (4/110)	0 (0/34)	0 (0/40)	0 (0/110)	6 (2/34)	5 (2/40)	5 (6/110)
Bazo ¹	6 (2/34)	5 (2/40)	4 (4/110)	0 (0/34)	0 (0/40)	0 (0/110)	6 (2/34)	5 (2/40)	5 (5/110)
Pool hígado-bazo¹	6 (2/34)	5 (2/40)	5 (2/40)	0 (0/34)	0 (0/40)	0 (0/40)	9 (3/34)	8 (3/40)	8 (3/40)
Pool de ciegos¹	6 (2/34)	5 (2/40)	5 (2/40)	0 (0/34)	0 (0/40)	0 (0/40)	6 (2/34)	5 (2/40)	5 (2/40)
Pool hisopados cloacales¹	3 (1/34)	3 (1/40)	2 (1/44)	0 (0/34)	0 (0/40)	0 (0/44)	3 (1/34)	3 (1/40)	2 (1/44)
Todas las muestras	14 (9/63)	12 (9/77)	1 (27/1807)	2 (1/63)	1 (1/77)	0,1 (1/1807)	6 (4/63)	5 (4/77)	1 (18/1807)

¹Se consideraron solamente las granjas y/o galpones donde se encontró al menos un ave muerta.

3.1.6.2. Granja de pollos parrilleros

En la **Tabla 35** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la prevalencia de *Salmonella* spp. de los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum para cada tipo de muestra analizada en las granjas de pollos parrilleros. Teniendo en cuenta todas las muestras analizadas, el porcentaje de aislamiento por granja fue de 13, 3 y 1 % para los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum, respectivamente. Teniendo en cuenta las muestras de hisopado de cama se obtuvo un porcentaje de aislamiento para SE entre 9 % (muestras individuales) y 13 % (granjas y galpones). Mientras que para ST se obtuvo porcentajes entre 2 % (muestras individuales) y 3 % (granjas y galpones). No se encontraron aislamientos de estos tres serotipos para las muestras de alimento, así como tampoco para SG en muestras de cama.

En cuanto a las aves muertas de las granjas de pollos parrilleros, no se aisló ST en ningún tipo de muestra, así como tampoco se aisló SE de muestras de inoculación directa de hígados y bazo ni tampoco SG del pool de hisopados cloacales. En una sola granja y galpón se aisló SE de las muestras de pooles de hígado- bazo, ciego e hisopados cloacales. En una sola granja y galpón se aisló SG provenientes de la inoculación directa de órganos, así como también los pooles de hígado-bazo y de ciegos confeccionados con los hígados y bazo positivos a la inoculación directa, Sin embargo, no se aisló este serovar de los pooles de hisopados cloacales.

Tabla 35. Aislamiento de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) y *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum (SG) en los diferentes tipos de muestras analizadas en granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos

Tipo de muestra	% positivos (N° positivos/ N° analizado)								
	SE			ST			SG		
	Granja	Galpón	Muestra individual	Granja	Galpón	Muestra individual	Granja	Galpón	Muestra individual
Hisopado de cama	13 (12/93)	9 (15/176)	9 (15/176)	3 (3/93)	2 (4/176)	2 (4/176)	0 (0/93)	0 (0/176)	0 (0/176)
Alimento	0 (0/93)	0 (0/105)	0 (0/315)	0 (0/93)	0 (0/105)	0 (0/315)	0 (0/93)	0 (0/105)	0 (0/315)
Hígado ¹	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/202)	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/202)	2 (1/59)	2 (1/64)	1 (3/202)
Bazo ¹	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/202)	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/202)	2 (1/59)	2 (1/64)	1 (3/202)
Pool hígado-bazo¹	2 (1/59)	2 (1/64)	2 (1/64)	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/64)	2 (1/59)	2 (1/64)	2 (1/64)
Pool de ciegos¹	2 (1/59)	2 (1/64)	2 (1/64)	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/64)	2 (1/59)	2 (1/64)	2 (1/64)
Pool hisopados cloacales¹	2 (1/59)	2 (1/64)	1 (1/70)	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/70)	0 (0/59)	0 (0/64)	0 (0/70)
Todas las muestras	13 (12/93)	9 (15/176)	2 (18/1093)	3 (3/93)	2 (4/176)	1 (6/1093)	1 (1/93)	1 (1/176)	1 (8/1093)

¹Se consideraron solamente las granjas y/o galpones donde se encontró al menos 1 ave muerta.

3.2. RENDIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES

3.2.1. Estudios de capacidad discriminatoria y concordancia

3.2.1.1. Granjas de gallinas de postura

En la **Tabla 36** se observan los parámetros de Se_r , Exa_r y VPN_r para los medios selectivos-diferenciales empleados por cada tipo de muestra. En relación a la Se_r , los valores estuvieron entre 0,60 a 1, y no se encontró diferencia significativa para ninguno de los medios empleados. Los menores valores de Se_r (0,60) estuvieron en las muestras de H15D. El resto de los valores fueron mayores a 0,79 para ese parámetro. La Exa_r y el VPN_r estuvieron entre 0,99 y 1,00, sin diferencias para ninguno de los medios utilizados. Debido a la ausencia de resultados falsos positivos, la Esp_r y el VPP_r para todos los medios de cultivos sólidos selectivos-diferenciales fueron de 1.

En la **Tabla 37** se muestra el análisis de concordancia entre los medios selectivos-diferenciales utilizados. La misma fue ligera a excelente, sin diferencia estadística entre los medios utilizados. La concordancia fue ligera para las muestras de huevo procesadas sin incubación de 15 días, y este parámetro pasó a ser muy bueno con dicha incubación. El resto de las comparaciones mostraron excelente concordancia. Sin embargo, aunque los agares MC y SS tuvieron una excelente concordancia para las muestras de hígado, bazo y pooles de hígado-bazo, ciego, hisopados cloacales de aves muertas y de aves vivas, no se pudo calcular la concordancia por la prueba de McNemar, debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

Tabla 36. Sensibilidad (Se_r), exactitud (Exa_r) y valor predictivo negativo relativos (VPN_r) para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato (XLD), Hektoen (HE), xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF-18, MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS), utilizados en distintas muestras provenientes de granjas de gallinas ponedoras. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Tipo de muestra	Medio selectivo	Se_r	Exa_r	VPN_r
Guano	HE	0,98 ^a (0,91-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)
	SS	0,96 ^a (0,88-0,99)	0,99 ^a (0,98-1,00)	0,99 ^a (0,98-1,00)
Alimento	XLDT	0,90 ^a (0,75-0,97)	0,99 ^a (0,98-1,00)	0,99 ^a (0,98-1,00)
	EF18	1,00 ^a (0,90-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
Huevo	HE	0,60 ^a (0,24-0,90)	1,00 ^a (0,98-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
	XLD	0,60 ^a (0,24-0,90)	1,00 ^a (0,98-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
Huevo 15 días	HE	0,80 ^a (0,41-0,98)	1,00 ^a (0,99-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
	XLD	1,00 ^a (0,61-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
Hisopado cloacal aves vivas	MC	1,00 ^a (0,22-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,22-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)
Hígado	MC	1,00 ^a (0,76-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,76-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)
Bazo	MC	1,00 ^a (0,72-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,72-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)	1,00 ^a (0,97-1,00)
Pool hígado-bazo	MC	1,00 ^a (0,61-1,00)	1,00 ^a (0,93-1,00)	1,00 ^a (0,92-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,61-1,00)	1,00 ^a (0,93-1,00)	1,00 ^a (0,92-1,00)
Pool de ciegos	MC	1,00 ^a (0,61-1,00)	1,00 ^a (0,93-1,00)	1,00 ^a (0,92-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,61-1,00)	1,00 ^a (0,93-1,00)	1,00 ^a (0,92-1,00)
Pool hisopados cloacales aves muertas	MC	1,00 ^a (0,37-1,00)	1,00 ^a (0,94-1,00)	1,00 ^a (0,93-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,37-1,00)	1,00 ^a (0,94-1,00)	1,00 ^a (0,93-1,00)

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma columna para el mismo tipo de muestra son significativamente distintos ($p < 0,05$).

Tabla 37. Concordancia entre los medios agarizados selectivos-diferenciales utilizados para la detección de *Salmonella* spp. en distintas muestras provenientes de granjas de gallinas ponedoras. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Tipo de muestra	Comparación	Índice Kappa ¹	p ²
Guano	HE-SS	0,96 (0,90-0,99)	1,000
Alimento	XLDT-EF-18	0,94 (0,86-0,99)	0,248
Huevo	HE-XLD	0,33 (0,08-0,68)	0,617
Huevo 15 días		0,89 (0,60-0,99)	1,000
Hisopado cloacal aves vivas	MC-SS	1,00 (0,37-1,00)	_ ³
Hígado inoculación directa		1,00 (0,85-1,00)	_ ³
Bazo inoculación directa		1,00 (0,83-1,00)	_ ³
Pool hígado-bazo		1,00 (0,74-1,00)	_ ³
Pool de ciegos		1,00 (0,74-1,00)	_ ³
Pool hisopados cloacales aves muertas		1,00 (0,55-1,00)	_ ³

¹Indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

²El valor de chi cuadrado se determinó con la prueba de McNemar's para muestras pareadas.

³ No se pudo realizar la prueba de McNemar's debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

XLD= agar xilosa-lisina desoxicolato; XLDT= agar XLD + tergitol; EF18= agar EF18; MC=agar MacConkey; SS=agar *Salmonella-Shigella*.

3.2.1.2. Granjas de pollos parrilleros

En la **Tabla 38** se observan los parámetros de SeR, ExaR y VPNR para los medios selectivos-diferenciales empleados por cada tipo de muestra. La SeR fue variable y estuvo entre 0 y 1. Sólo se encontró diferencia significativa entre los medios en el caso de los empleados para el aislamiento de *Salmonella* spp. en alimento balanceado (0,93 y 0,80 para XLDT y EF-18, respectivamente). En cuanto a la SeR de los medios MC y SS en las muestras procesadas provenientes de aves muertas se encontraron valores dispersos dependiendo de la muestra a analizar. Para el caso de muestras de inoculación directa, se encontró una sensibilidad de 1 para ambos medios de cultivo en el caso de hígados y de 0,67 y 1,00 para MC y SS, respectivamente, para el caso de los bazos. En relación a los diferentes *pools* se encontró que la SeR varió desde 0 hasta 1,00 para MC

y de 0,33 a 1,00 para SS. Los valores de ExaR y el VPPR estuvieron entre 0,97 y 1,00 para todos los medios de cultivos empleados y sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) en la ExaR de los medios empleados para el aislamiento de *Salmonella* spp. en alimento (XLD y EF-18). Debido a la ausencia de resultados falsos positivos, la EspR y el VPPR para todos los medios de cultivos sólidos selectivos-diferenciales fue de 1.

En la **Tabla 39** se muestra el análisis de concordancia entre los medios selectivos-diferenciales utilizados para el aislamiento de *Salmonella* spp. en los diferentes tipos de muestras. La misma fue excelente para los agares XLD y HE para muestras de hisopado de cama y muy buena para los agares XLD y EF-18 para las muestras de alimento. En cuanto a los agares MC y SS utilizados para el aislamiento de *Salmonella* spp. en muestras provenientes de aves muertas, los valores fueron variables, según el tipo de muestra analizada, por lo que se encontró una excelente concordancia para los medios en la inoculación directa de hígado, y una buena concordancia para la inoculación directa de bazos y *pool* de hígados-bazos. A su vez, se encontró una concordancia débil ($Kappa=0,49$) y nula ($Kappa=0$) para las muestras de hisopado cloacal de aves muertas y *pool* de ciegos, respectivamente. En ninguno de los pares de medios de cultivos analizados se encontró diferencia significativa al realizar la prueba de McNemar y para el caso de los medios MC y SS en muestras de inoculación directa de hígado no se pudo realizar la prueba de McNemar debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

Tabla 38. Sensibilidad (SeR), exactitud (ExaR) y Valor predictivo negativo (VPNR) relativos para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato (XLD), Hektoen (HE), xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF-18, MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS) utilizados en distintas muestras provenientes de granjas de pollos parrilleros. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Tipo de muestra	Medio selectivo	SeR	ExaR	VPNR
Hisopado de cama	XLD	0,97 ^a (0,90-1,00)	0,99 ^a (0,96-1,00)	0,98 ^a (0,95-1,00)
	HE	0,97 ^a (0,90-1,00)	0,99 ^a (0,96-1,00)	0,98 ^a (0,95-1,00)
Alimento	XLDT	0,93 ^a (0,85-0,97)	0,99 ^a (0,99-1,00)	0,99 ^a (0,98-1,00)
	EF-18	0,80 ^b (0,69-0,89)	0,98 ^b (0,97-0,99)	0,98 ^a (0,97-0,99)
Hígado	MC	1,00 ^a (0,47-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,47-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
Bazo	MC	0,67 ^a (0,23-0,96)	1,00 ^a (0,98-1,00)	1,00 ^a (0,98-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,47-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)	1,00 ^a (0,99-1,00)
Pool hígado-bazo	MC	0,50 ^a (0,09-0,91)	0,98 ^a (0,93-1,00)	0,98 ^a (0,93-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,37-1,00)	1,00 ^a (0,95-1,00)	1,00 ^a (0,95-1,00)
Pool de ciegos	MC	0,00 ^a (0,00-0,63)	0,97 ^a (0,90-1,00)	0,97 ^a (0,90-1,00)
	SS	1,00 ^a (0,37-1,00)	1,00 ^a (0,95-1,00)	1,00 ^a (0,95-1,00)
Pool hisopados cloacales	MC	1,00 ^a (0,47-1,00)	1,00 ^a (0,96-1,00)	1,00 ^a (0,96-1,00)
	SS	0,33 ^a (0,04-0,77)	0,97 ^a (0,91-1,00)	0,97 ^a (0,91-1,00)

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma columna para el mismo parámetro son significativamente distintos ($p < 0,05$).

Tabla 39. Concordancia entre los medios agarizados selectivos-diferenciales utilizados para la detección de *Salmonella* spp. en distintas muestras provenientes de granjas de pollos parrilleros. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Tipo de muestra	Comparación	Índice Kappa ¹	p ²
Hisopado de cama	XLD-HE	0,95 (0,89-0,98)	0,617
Alimento	XLDT-EF18	0,84 (0,75-0,90)	0,080
Hígado inoculación directa	MC-SS	1,00 (0,65-1,00)	- ³
Bazo inoculación directa		0,80 (0,41-0,98)	1,000
Pool hígado-bazo		0,66 (0,23-0,96)	1,000
Pool de ciegos		0,00 (0,00-0,63)	0,480 ⁴
Pool hisopados cloacales		0,49 (0,15-0,85)	0,480

¹ Indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

² El valor de chi cuadrado se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

³ No se pudo realizar la prueba de McNemar debido a que en todos los casos se aisló *Salmonella* spp. de ambos medios agarizados.

⁴ Tuvo en cuenta los negativos para ambos medios de cultivo, que fueron 62 sobre un total de 64.

XLD= agar xilosa-lisina desoxicolato; XLDT=agar xilosa-lisina desoxicolato con tergitol; EF18= agar EF18; MC=agar MacConkey; SS=agar *Salmonella-Shigella*.

3.2.1.3. Hígados de pollos parrilleros para consumo

Estudiando individualmente las técnicas empleadas se obtuvo que 32 (4,80 %) y 3 (0,45 %) de las 666 muestras de hígado de pollo fueron positivas para *Salmonella* spp. en el método de preenriquecimiento y el método de inoculación directa, respectivamente. Estos porcentajes fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). A su vez, las tres muestras de hígado que fueron positivas a *Salmonella* spp. por inoculación directa también fueron positivas por el método de preenriquecimiento. En total se aislaron 47 cepas por el método de preenriquecimiento y 3 cepas por el método de inoculación directa.

Debido a la ausencia de muestras falsas positivas, los valores de especificidad y valor predictivo positivo para los dos métodos de cultivo y los dos medios selectivos-diferenciales fue de 1. A su vez, se encontró diferencia estadística en la SeR, ExaR, y VPNR entre los métodos de preenriquecimiento e inoculación directa. El método con preenriquecimiento tuvo mayores valores para estos parámetros. Teniendo en cuenta el

índice Kappa se encontró una concordancia pobre entre estos dos métodos, existiendo diferencias significativas entre los mismos (**Tabla 40**).

Tabla 40. Sensibilidad (Se_r), exactitud (Exa_r) y valor predictivo negativo relativos (VPN_r) y concordancia (coeficiente kappa y prueba de McNemar) para el aislamiento de *Salmonella* spp. en muestras de hígado de pollos parrilleros recolectadas de los mercados de Entre Ríos, procesadas según los métodos de preenriquecimiento previo y inoculación directa. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Método	Se_r	Exa_r	VPN_r	Índice Kappa ¹	p^2
Pre enriquecimiento	1,00 ^a (0,91-1,00)	1,00 ^a (1,00-1,00)	1,00 ^a (1,00-1,00)	0,16 (0,00-0,46)	0,0001
Inoculación directa	0,09 ^b (0,02-0,22)	0,96 ^b (0,94-0,97)	0,96 ^b (0,94-0,97)		

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($p < 0,05$).

¹Indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$)

²El valor de chi cuadrado se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

Los resultados de Se_r , EXa_r , VPN_r y concordancia (coeficiente kappa y prueba de McNemar) para los medios selectivos-diferenciales utilizados en los dos métodos de cultivo se muestran en la **Tabla 41**. Estos parámetros fueron estadísticamente diferentes entre MC y MLIA en los dos métodos de cultivo; el segundo presentó valores mayores que MC para estos parámetros en ambos métodos de cultivo. En todas las muestras positivas para el método de preenriquecimiento se pudo aislar *Salmonella* spp. en MLIA (32/32), mientras que solo 15 muestra se pudo aislar con MC. Por ello, la concordancia fue buena, pero hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los medios selectivos-diferenciales.

Por otro lado, no se aisló *Salmonella* spp. con MC por el método de inoculación directa. Sin embargo, como tan solo en 3 muestras se aisló este patógeno con MLIA, no se encontró diferencia significativa entre este medio y MC ($p > 0,05$), aun cuando la concordancia fue nula.

Tabla 41. Sensibilidad (Se_r), exactitud (Exa_r) y valor predictivo negativo relativos (VPN_r) y concordancia (coeficiente kappa y prueba de McNemar) para el aislamiento de *Salmonella* spp. en los dos métodos empleados en muestras de hígado de pollos parrilleros recolectadas de los mercados de Entre Ríos, procesadas según los métodos de preenriquecimiento previo y inoculación directa y sembradas en agar lisina hierro modificado (MLIA) y agar MacConkey (MC). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro

Método	Medio selectivo	N° muestras positivas	Se_r	Exa_r	VPN_r	Índice Kappa ¹	p^2
Pre enriquecimiento	MLIA	32	1 ^a (0,91-1,00)	1 ^a (1,00-1,00)	1 ^a (1,00-1,00)	0,63 (0,45-0,80)	0,0001
	MC	15	0,47 ^b (0,31-0,64)	0,97 ^b (0,96-0,98)	0,97 ^b (0,96-0,98)		
Inoculación directa	MLIA	3	1 ^a (0,47-1,00)	1 ^a (0,99-1,00)	1 ^a (1,00-1,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,248
	MC	0	0 ^b (0,00-0,53)	1 ^a (1,00-1,00)	1 ^a (0,99-1,00)		

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($p < 0,05$).

¹ Indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

² El valor de chi cuadrado se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

3.3. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO

3.3.1. Resultado de los cuestionarios

3.3.1.1. Granjas de gallinas de postura

Los resultados del cuestionario de las granjas están en la **Tabla 42**. Se puede observar que el 81 % de las granjas muestreadas se encontraban en el departamento Paraná, y que la mayoría de las granjas presentaban 5 o menos galpones (79 %). El 75 % de las granjas tenía una capacidad instalada de hasta 50.000 aves. En cuanto a la bioseguridad, la mayoría de las granjas tenían cerco perimetral y realizaban controles de roedores. El 63 % de las granjas cumplía la distancia mínima de separación con otras granjas avícolas y tan solo el 2 % de las granjas contaban con equipamiento para el ingreso de personas. A su vez, el 71 % de las granjas tenían equipo para desinfección de vehículos, de las cuales el 84 % se encontraba en condiciones de ser utilizado. En el 84 % de las granjas existía al menos otra especie de animales en la granja.

El sistema para eliminación de cadáveres más empleado fue el descarte de los mismos en fosas, tanto abierta como cerrada (83 %). El 57 % de las granjas realizaban el control de moscas, y solo el 19 % de las granjas llevaban un registro foliado de prácticas de higiene y bioseguridad. En 20 de las 63 granjas muestreadas se encontró antecedentes de alguna enfermedad y solo 6 de ellas fue diagnosticada como salmonelosis.

La totalidad de las granjas tenían agua de pozo y el 11 y 42 % de las granjas realizaba la desinfección del agua y análisis de potabilidad, respectivamente. Con respecto al alimento balanceado que consumían las aves, en el 84 % de las granjas era elaborado por los mismos productores. En cuanto a agregados que poseía el mismo, en el 11, 35 y 98 % tenían antibióticos/desinfectantes, acidificantes y secuestrante de micotoxinas, respectivamente. A su vez, en el 84 % del alimento se elaboraba en forma de harina.

En cuanto a la producción de huevos, el 46 % de las granjas lo comercializaba para consumo exclusivamente, mientras que el 52 % distribuía su producción entre consumo e industrialización. Por otro lado, el maple más utilizado era el de cartón, debido a que el 56 % de las granjas utilizaban este tipo exclusivamente. A su vez, el 41 % utilizaban maples de plástico y cartón, en el 60 % de las granjas reutilizaban los maples, pero solo el 29 % los lavaba y desinfectaba antes de reutilizarlos.

Los resultados de las encuestas basadas en los 77 galpones muestreados están en la **Tabla 43**. Los resultados indicaron que el 65 y el 26 % tenían la línea genética de aves Hy-line y Lohmann, respectivamente. En los galpones muestreados, el 73 % de los mismos tenían 10.000 o menos aves, distribuidas en el 78 % de los casos en hasta 4 aves por jaula, y en aproximadamente la mitad de los galpones había 2 o menos niveles de jaulas superpuestas y cantidad de filas.

En el momento de realizar el muestreo, el 53 % de los galpones tenía aves con 80 o menos semanas de edad. En cuanto al porcentaje de postura se encontró que el 53 % de los galpones tenía porcentajes de postura de al menos el 75 %. El 56 % de los galpones se encontraban vacunados contra *Salmonella* spp. y las aves de solo 3 galpones se encontraban medicadas al momento del muestreo. En lo que respecta a las características del galpón, el 82 % de los muestreados eran de características manuales, y solo el 36 % poseía tejido en los laterales de los galpones, mientras que casi la totalidad de los galpones tenía el espacio que rodea el galpón desmalezado y limpio.

Tabla 42. Resultados generales de la encuesta realizada en las 63 granjas muestreadas. Se indica el número de granjas con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario

Aspectos de la encuesta	Nº de granjas (% sobre total de granjas)
IDENTIFICACIÓN	
Departamento	
Paraná	51 (81)
Diamante	12 (19)
Número total de galpones	
Menor o igual a 5 galpones	50 (79)
Mayor a 5 galpones	13 (21)
Capacidad Instalada	
Menor o igual a 50.000 aves	47 (75)
Mayor a 50.000 aves	16 (25)
BIOSEGURIDAD	
Cerco perimetral y puerta de entrada	57 (90)
¿Cumple distancias de separación con granjas vecinas?	40 (63)
¿Posee equipos de desinfección (vehículos, equipos, jaulas e implementos)?	45 (71)
¿Funcionan los equipos de desinfección?	38 de 45 (84)
¿Posee equipamiento para el ingreso de personas?	1 (2)
¿Existen otras especies en el predio?	53 (84)
Sistema de eliminación de cadáveres	
Composta	7 (11)
Fosa abierta	13 (21)
Fosa cerrada	39 (62)
Incineración abierta	3 (5)
otro sistema	1 (1)
Control de moscas	36 (57)
Control de roedores	55 (87)
¿Posee registro foliado de prácticas de higiene y bioseguridad?	12 (19)
ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD	
Antecedentes de alguna enfermedad	20 (32)
Salmonelosis	6 de 20 (30)
AGUA	
Origen	
Pozo	63(100)
Otro	0 (0)
Desinfección	7 (11)

Continuación de la Tabla 42.

Aspectos de la encuesta		Nº de granjas (% sobre total de granjas)
ALIMENTO		
Origen		
	Elaboración propia	53 (84)
	Compra a terceros	10 (16)
Presentación		
	Pellet	10 (16)
	Harina	53 (84)
Desinfección y/o antibióticos		7 (11)
Acidificantes		22 (35)
Secuestrante de micotoxinas		62 (98)
HUEVO		
Destino		
	Consumo	29 (46)
	Industrialización	1 (2)
	Ambos	33 (52)
Lavado y desinfección		0 (0)
MAPLE		
Tipo		
	Cartón	35 (56)
	Plástico	2 (3)
	Ambos	26 (41)
Reutilización		38 (60)
Lavado y desinfección		18 (29)

Tabla 43. Resultados generales de la encuesta realizada en las 63 granjas muestreadas. Se muestran los resultados en base a los 77 galpones muestreados. Se indica el número de galpones con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario.

Aspectos de la encuesta	Nº de galpones (% sobre total de galpones)
GALPÓN	
Línea genética	
Hy-line	50 (65)
Lohmann	20 (26)
Otra	7 (9)
Cantidad de aves	
Menor o igual a 10.000 aves	56 (73)
Mayor a 10.000 aves	21 (27)
Cantidad de aves por jaula	
Menor o igual a 4	60 (78)
Mayor a 4	17 (22)
Niveles de jaulas superpuestas	
Menor o igual a 2	36 (47)
Mayor a 2	41 (53)
Cantidad de filas	
Menor o igual a 2	33 (43)
Mayor a 2	44 (57)
Cantidad de tolvas	
Menor o igual a 4	49 (64)
Mayor a 4	28 (36)
Edad aves	
Menor o igual de 80 semanas	41 (53)
Mayor de 80 semanas	36 (47)
Porcentaje de postura	
Menor o igual a 75 %	36 (47)
Mayor a 75 %	41 (53)
Medicación	3 (4)
Vacuna contra <i>Salmonella</i> spp.	43 (56)
Características del galpón	
Automático	14 (18)
Manual	63 (82)
Espacio que rodea el galpón desmalezado y limpio	75 (97)
Lateral del galpón con tejido	28 (36)
Cinta transportadora de guano	14 (18)

3.3.1.2. Granjas de pollos parrilleros

Los resultados del cuestionario por granja se describen en la **Tabla 44**. El 51 % de las granjas muestreadas se encontraba en el departamento Uruguay, y que la mayoría de las granjas tenían 5 o menos galpones (91 %). El 85 % de las granjas presentaban una capacidad instalada de hasta 50.000 aves. En cuanto a la bioseguridad, la mayoría de las granjas contaban con cerco perimetral, equipo de desinfección funcionando y realizaban controles de roedores al momento de la encuesta. El 42 % de las granjas cumplían la distancia mínima de separación con otras granjas avícolas y el 12 % de las granjas contaban con equipamiento para el ingreso de personas. En el 87 % de las granjas existía al menos otra especie de animales en la granja, y el 12 % de las granjas se encontraban a 1.000 metros o menos de distancia de una granja de cerdos. El sistema para eliminación de cadáveres predominante fue la composta, siendo así que el 86 % lo realiza mediante este método. El 28 % de las granjas realizaban el control de moscas, y tan solo el 6 % de las granjas llevaban un registro foliado de prácticas de higiene y bioseguridad. En 19 de las 93 granjas muestreadas se encontró antecedentes de alguna enfermedad y solo el 5 % (1 de 19) de ellas fue diagnosticada previamente como salmonelosis.

La totalidad de las granjas poseían agua de pozo y el 55 y 56 % de las granjas realizó la desinfección del agua y análisis de potabilidad, respectivamente. En la totalidad de las granjas el alimento que consumían las aves era administrado por la empresa integradora y en un 99 % fue en forma de pellet. El alimento se encontraba en la granja durante 3 o menos días en el 77 % de los casos. En cuanto al agregado de sustancias inhibidoras, aproximadamente la mitad agregaban antibióticos/desinfectantes (52 %) o acidificantes (46 %) y solo el 8 % tenían probióticos.

Tabla 44. Resultados generales de la encuesta realizada en las 93 granjas muestreadas. Se indica el número de granjas con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario.

Aspectos de la encuesta	Nº de granjas (% sobre total de granjas)
IDENTIFICACIÓN	
Departamento	
Uruguay	47 (51)
Colón	31 (33)
Guaileguaychú	15 (16)
Número total de galpones	
Menor o igual a 5 galpones	85 (91)
Mayor a 5 galpones	8 (9)
Capacidad Instalada	
Menor o igual a 50.000 aves	79 (85)
Mayor a 50.000 aves	14 (15)
BIOSEGURIDAD	
Cerco perimetral y puerta de entrada	92 (99)
¿Cumple distancias de separación con granjas vecinas?	39 (42)
¿Posee equipos de desinfección (vehículos, equipos, jaulas e implementos)?	84 (90)
¿Funcionan los equipos de desinfección?	78 de 84 (93)
¿Posee equipamiento para ingreso de personas?	11 (12)
¿Existen otras especies en el predio?	81 (87)
Distancia con criaderos de cerdos	
Menor a 1.000 metros	11 (12)
Mayor a 1.000 metros	82 (88)
Sistema de eliminación de cadáveres	
Composta	80 (86,0)
Fosa abierta	2 (2,2)
Fosa cerrada	3 (3,2)
Incineración abierta	4 (4,3)
Incineración cerrada	2 (2,2)
otro sistema	2 (2,2)
Control de moscas	26 (28)
Control de roedores	88 (95)
¿Posee registro foliado de prácticas de higiene y bioseguridad?	6 (6)
ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD	
Antecedentes de alguna enfermedad	19 (20)
Salmonelosis	1 de 19 (5)

Continuación de la Tabla 44.

Aspectos de la encuesta		Nº de granjas (% sobre total de granjas)
AGUA		
Origen		
	Pozo	93 (100)
	Otro	0 (0)
Desinfección		51 (55)
¿Realiza análisis del agua?		52 (56)
ALIMENTO		
Origen		
	Integrador	93 (100)
	Otro	0 (0)
Presentación		
	Pellet	92 (99)
	Harina	1 (1)
Desinfección y/o antibióticos		48 (52)
Acidificantes		43 (46)
Probióticos		7 (8)
Tiempo de almacenamiento		
	3 o menos días	72 (77)
	más de 3 días	21 (23)

Los datos de la encuesta analizados por galpón se presentan en la **Tabla 45**. De los 176 galpones muestreados, se encontraron 3 líneas genéticas, con preponderancia de la línea Cobb (56 %), seguida por Arbor Acres (36 %) y Ross (13 %). En el 55 % de los galpones muestreados la cantidad de aves fue inferior a las 10.000. En cuanto a los comederos, en el 51 % de los casos fueron del tipo automático y los bebederos en su mayoría (87 %) fueron del tipo niple, mientras que el resto fueron del tipo canaleta, plasjon y plato orbital. Teniendo en cuenta que uno de los requisitos para la selección de los galpones a muestrear fue que la edad de las aves fuese de 28 o más días, se obtuvo que en un 51 % de los galpones muestreados las aves tenían 37 o menos días de edad. El 10 % de los galpones muestreados se encontraban siendo medicados al momento de la toma de muestra y el 3 % de los galpones contaba con vacuna contra *Salmonella* spp. El 52 % de los galpones eran del tipo automático, y el material de la cama predominante fue la cáscara de arroz con el 81 % de los galpones utilizando este material. A su vez, se encontró que la cama fue reutilizada en 3 o menos casos en el 89 % de los galpones. La mayoría de galpones mostraron el espacio que lo rodea limpio y desmalezado al momento del muestreo y tenían malla o algún tipo de tejido en los laterales de los galpones. Por otro lado, en el momento del muestreo se encontró que el 61 % de los galpones tenían una mortandad acumulada menor o igual al 4 %.

Tabla 45. Resultados generales de la encuesta realizada en las 93 granjas muestreadas. Se muestran los resultados en base a los 176 galpones muestreados. Se indica el número de galpones con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario

Aspectos de la encuesta	Nº de galpones (% sobre total de galpones)
GALPÓN	
Línea genética	
Cobb	99 (56)
Ross	13 (8)
Arbor Acre	64 (36)
Cantidad de aves	
Menor a 10.000 aves	97 (55)
Mayor a 10.000 aves	79 (45)
Tipo de comedero	
Automático	90 (51)
Manual	86 (49)
Tipo de bebedero	
Niple	153 (87)
Canaleta	12 (7)
Plasson o plato orbital	11 (6)
Edad aves	
Menor o igual de 37 días	89 (51)
Mayor de 37 días	87 (49)
Medicación	17 (10)
Vacuna contra <i>Salmonella</i> spp.	6 (3)
Material cama	
Cáscara de arroz	143 (81)
Otros	33 (19)
Número de crianzas de la cama	
Menor o igual de 3	156 (89)
Mayor de 3	20 (11)
Características del galpón	
Automático	92 (52)
Manual	84 (48)
Espacio que rodea el galpón desmalezado y limpio	169 (96)
Lateral del galpón con tejido	170 (97)
Porcentaje de mortandad acumulada	
Menor o igual a 4 %	108 (61)
Mayor a 4 %	68 (39)

3.3.2. Procesado de los datos y análisis estadístico para asociar factores de riesgos a la presencia de *Salmonella* spp.

3.3.2.1. Granjas de gallinas de postura

En la **Tabla 46** se muestran los resultados para el análisis univariado (χ^2 ó el test de Fisher) en la determinación de los factores de riesgo. Las variables estadísticamente significativas asociadas a la presencia de *Salmonella* spp. con un valor de $p < 0,15$ en los galpones fueron: departamentos categorizados (Paraná y Diamante), cerco perimetral, distancias con granjas vecinas, otras especies en el predio, origen del alimento categorizado (elaboración propia y otros), sitio de toma de muestra categorizado (tolva y otros), presentación del alimento categorizados (harina y pellet), tipo de maple categorizados (cartón y plástico/cartón), cantidad de aves por jaula categorizados (≤ 4 y > 4), niveles de jaulas superpuestas categorizados (≤ 2 y > 2), cantidad de filas categorizados (≤ 2 y > 2), edad de las aves categorizados (≤ 80 y > 80 semanas), vacuna contra *Salmonella* spp., características del galpón categorizados (automático y manual) y cinta transportadora de guano.

Posteriormente, se realizó el análisis multivariado de regresión logística, mediante el cual se obtuvo a través del test de Hosmer-Lemeshow un valor de significancia de 0,805, lo cual indica que no hay significancia. Por lo tanto, existe ajuste global del modelo. En la **Tabla 47** se detallan los resultados del análisis multivariado de regresión logística para las variables que resultaron del análisis univariado. De acuerdo con estos resultados, las variables departamentos categorizados (Paraná y Diamante), tipo de maple categorizados (cartón y plástico/cartón) y edad de las aves categorizados (≤ 80 y > 80 semanas) fueron las únicas que presentaron diferencias significativas. La razón de probabilidades (OR) para la ubicación de los galpones fue de 9,5. Por lo tanto, los galpones de las granjas que se encontraban en el departamento de Paraná presentaron 9,5 veces más riesgo de presencia de *Salmonella* spp. que aquellos que se encontraban en el departamento de Diamante. Por otro lado, aquellos galpones que utilizaban maples de cartón poseían 6,2 veces más probabilidades de tener *Salmonella* spp. con respecto a aquellos galpones que utilizaban maples tanto de cartón y de plástico. Por último, aquellos galpones en el que las aves tenían más de 80 semanas de edad tenían 8,2 veces más probabilidades de tener *Salmonella* spp. con respecto a los galpones que tenían gallinas de menos de 80 semanas de edad.

Al evaluar la existencia de asociación entre los factores de riesgo y las variables que quedaron fuera del modelo, se encontró que la ubicación de los galpones estaba relacionada con las distancias de granjas vecinas ($p = 0,028$). La variable tipo de maple empleado estuvo asociada a otras especies en el predio ($p = 0,050$). Y por último la variable edad de las aves estuvo relacionada con presencia de cerco perimetral ($p = 0,023$), origen del alimento ($p = 0,037$) y presentación del alimento ($p = 0,022$). Por otro lado, el sitio de toma de muestra categorizado, cantidad de aves por jaula categorizados, niveles de jaulas superpuestas categorizados, cantidad de filas categorizados, vacuna

contra *Salmonella* spp., características del galpón categorizados y cinta transportadora de guano no presentaron asociación con ninguno de las otras variables.

Tabla 46. Resultados del análisis univariado para la identificación de los factores de riesgo ($p < 0,15$) para la presencia de *Salmonella* spp. en galpones de granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

Variable	Números de galpones para cada categoría (%)	Números de galpones positivos a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Valor p
Departamento			
Paraná (0)	63 (82)	30 (94)	0,022
Diamante (1)	14 (18)	2 (6)	
Nº de galpones			
≤ 5 galpones (0)	48 (62)	21 (66)	0,616
> 5 galpones (1)	29 (38)	11 (34)	
Cerco perimetral			
No (0)	6 (8)	0 (0)	0,031
Si (1)	71 (92)	32 (100)	
Distancias con granjas vecinas			
No (0)	31 (40)	16 (50)	0,142
Si (1)	46 (60)	16 (50)	
Equipo de desinfección funcionando			
No (0)	22 (29)	10 (31)	0,661
Si (1)	55 (71)	22 (69)	
Equipo para el ingreso de personas			
No (0)	76 (99)	32 (100)	0,396
Si (1)	1 (1)	0 (0)	
Otras especies en el predio			
No (0)	11 (14)	2 (6)	0,089
Si (1)	66 (86)	30 (94)	
Eliminación de cadáveres			
Fosa cerrada (0)	46 (60)	21 (66)	0,375
Otro (1)	31 (40)	11 (34)	
Control de moscas			
No (0)	32 (42)	15 (47)	0,425
Si (1)	45 (58)	17 (53)	
Control de roedores			
No (0)	10 (13)	4 (13)	0,915
Si (1)	67 (87)	28 (87)	
Registro foliado			
No (0)	59 (77)	27 (84)	0,175
Si (1)	18 (23)	5 (16)	
Enfermedades previas			
No (0)	50 (65)	23 (72)	0,282
Si (1)	27 (35)	9 (28)	

Continuación de la Tabla 46.

Variable	Números de galpones para cada categoría (%)	Números de galpones positivos a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Valor p
Salmonelosis			
No (0)	70 (91)	30 (94)	0,465
Si (1)	7 (9)	2 (6)	
Abastecimiento de agua			NC ¹
Pozo (0)	176 (100)	80 (100)	
Otro (1)	0 (0)	0 (0)	
Desinfección del agua			0,465
No (0)	70 (91)	30 (94)	
Si (1)	7 (9)	2 (6)	
Análisis del agua			0,307
No (0)	39 (51)	14 (44)	
Si (1)	38 (49)	18 (56)	
Origen del alimento			0,011
Elaboración propia (0)	65 (84)	31 (97)	
Otro (1)	12 (16)	1 (3)	
Sitio de toma de muestra			0,057
Tolva (0)	65 (84)	30 (94)	
Otro (1)	12 (16)	2 (6)	
Presentación del alimento			0,007
Harina (0)	64 (83)	31 (97)	
Pellet (1)	13 (17)	1 (3)	
Desinfección del alimento			0,915
No (0)	67 (87)	28 (87)	
Si (1)	10 (13)	4 (13)	
Acidificantes en el alimento			0,763
No (0)	52 (68)	21 (66)	
Si (1)	25 (32)	11 (34)	
Secuestrantes de micotoxinas			0,227
No (0)	2 (3)	0 (0)	
Si (1)	75 (97)	32 (100)	
Destino de los huevos			0,181
Consumo (0)	34 (44)	17 (53)	
Industrialización/consumo (1)	43 (56)	15(44)	
Tipo de maple			0,035
Cartón (0)	42 (55)	22 (69)	
Plástico/cartón	35 (45)	10 (31)	
Reutilización de maple			0,256
No (0)	28 (36)	14 (44)	
Si (1)	49 (64)	18 (56)	
Lavado y desinfección de maple			0,419
No (0)	59 (77)	26 (81)	
Si (1)	18 (23)	6 (19)	

Continuación de la Tabla 46.

Variable	Números de galpones para cada categoría (%)	Números de galpones positivos a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Valor p
Línea genética aves			
Hy-Line(0)	50 (65)	19 (59)	0,389
Otras (1)	27 (35)	13 (41)	
Cantidad de aves			
≤ 10.000 (0)	51 (66)	19 (59)	0,283
> 10.000 (1)	26 (34)	13 (41)	
Cantidad de aves por jaula			
≤ 4 (0)	60 (78)	21 (66)	0,028
> 4 (1)	17 (22)	11 (34)	
Niveles de jaulas superpuestas			
≤ 2 (0)	62 (81)	22 (69)	0,028
> 2 (1)	15 (19)	10 (31)	
Cantidad de tolvas			
≤ 4 (0)	49 (64)	18 (56)	0,256
> 4 (1)	28 (36)	14 (44)	
Cantidad de filas			
≤ 2 (0)	33 (43)	10 (31)	0,083
> 2 (1)	44 (57)	22 (69)	
Edad de las aves			
≤ 80 semanas (0)	34 (44)	10 (31)	0,054
> 80 semanas (1)	43 (56)	22 (69)	
Porcentaje de postura			
≤ 75 % (0)	41 (53)	18 (56)	0,656
> 75 % (1)	36 (47)	14 (44)	
Medicación			
No (0)	74 (96)	31 (97)	0,768
Si (1)	3 (4)	1 (3)	
Vacuna contra <i>Salmonella</i> spp.			
No (0)	34 (44)	11 (34)	0,145
Si (1)	43 (56)	21 (66)	
Características del galpón			
Automático (0)	63 (82)	22 (69)	0,012
Manual (1)	14 (18)	10 (31)	
Lateral del galpón limpio			
No (0)	2 (3)	0 (0)	0,227
Si (1)	75 (97)	32 (100)	
Lateral del galpón con malla			
No (0)	49 (64)	19 (59)	0,512
Si (1)	28 (36)	13 (41)	
Cinta transportadora de guano			
No (0)	63 (82)	22 (69)	0,012
Si (1)	14 (18)	10 (31)	

¹ NC: no calculado porque todos tuvieron solo una opción de respuesta.

Tabla 47. Resultado del análisis multivariado para la identificación de los factores de riesgo ($p < 0,05$) para la presencia de *Salmonella* spp. en galpones de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

Variable	OR*	Valor p
Departamento Paraná (0) Diamante (1)	9,479	0,049
Cerco perimetral No (0) Si (1)		0,988
Distancias con granjas vecinas No (0) Si (1)		0,153
Otras especies en el predio No (0) Si (1)		0,980
Origen del alimento Elaboración propia (0) Otro (1)		0,145
Sitio de toma de muestra Tolva (0) Otro (1)		0,061
Presentación del alimento Harina (0) Pellet (1)		0,231
Tipo de maple Cartón (0) Plástico/cartón (1)	6,180	0,033
Cantidad de aves por jaula ≤ 4 (0) > 4 (1)		0,564
Niveles de jaulas superpuestas ≤ 2 (0) > 2 (1)		1,000
Cantidad de filas ≤ 2 (0) > 2 (1)		0,744
Edad de las aves ≤ 80 semanas (0) > 80 semanas (1)	8,164	0,009
Vacuna contra <i>Salmonella</i> spp. No (0) Si (1)		0,345
Características del galpón Automático (0) Manual (1)		1,000
Cinta transportadora de guano No (0) Si (1)		0,294

*OR: razón de probabilidades (por sus siglas en inglés, odds ratio)

3.3.2.2. Granjas de pollos parrilleros

En la **Tabla 48** se muestran los resultados para el análisis univariado (χ^2 ó el test de Fisher) en la determinación de los factores de riesgo. Las variables estadísticamente significativas asociadas a la presencia de *Salmonella* spp. con un valor de $p < 0,15$ en los galpones fueron 7: N° de galpones categorizados (< 5 galpones y ≥ 5 galpones), control de roedores, desinfección del alimento, tiempo de almacenamiento del alimento categorizado (< 3 días y ≥ 3 días), cantidad de aves categorizadas (< 10.000 y ≥ 10.000), tipo de bebedero categorizado (niple y otros) y uso de vacuna. Las variables abastecimiento de agua y origen del alimento no se incluyeron en el estudio debido a que la totalidad de las granjas utilizan agua de pozo como abastecimiento de la misma y el alimento es proporcionado por la empresa integradora.

Posteriormente se realizó el análisis multivariado de regresión logística, mediante el cual se obtuvo a través del test de Hosmer-Lemeshow un valor de significancia de 0,126, lo cual indicó que no hay significancia. Por lo tanto, existió ajuste global del modelo. En la **Tabla 49** se detallan los resultados del análisis multivariado de regresión logística para las variables que resultaron del análisis univariado. De acuerdo con estos resultados, las 7 variables seleccionadas quedaron fuera del modelo de regresión logística binaria ($p > 0,05$). Por ello, no se pudo asociar ningún factor de riesgo al aislamiento de *Salmonella* spp. en granjas de pollos parrilleros de la zona de mayor densidad de granjas en la provincia de Entre Ríos.

Tabla 48. Resultados del análisis univariado para la identificación de los factores de riesgo ($p < 0,15$) para la presencia de *Salmonella* spp. en galpones de granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.

Variable	Números de galpones para cada categoría (%)	Números de galpones positivos a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Valor p
Departamento			
Uruguay (0)	90 (51)	37 (46)	0,236
Colón y Gualaguaychú (1)	86 (49)	43 (54)	
N° de galpones			
< 5 galpones (0)	152 (86)	65 (81)	0,071
≥ 5 galpones (1)	24 (14)	15 (19)	
Cerco perimetral			
No (0)	2 (1)	0 (0)	0,194
Si (1)	174 (99)	80(100)	
Distancias con granjas vecinas			
No (0)	103 (59)	46 (58)	0,802
Si (1)	73 (41)	34 (42)	

Continuación de la Tabla 48.

Variable	Números de galpones para cada categoría (%)	Números de galpones positivos a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Valor p
Equipo de desinfección funcionando			
No (0)	29 (17)	11 (14)	0,373
Si (1)	147 (84)	69 (86)	
Equipo para el ingreso de personas			
No (0)	154 (88)	67 (84)	0,170
Si (1)	22 (12)	13 (16)	
Otras especies en el predio			
No (0)	24 (14)	11 (14)	0,968
Si (1)	152 (86)	69 (86)	
Distancia criaderos de cerdos			
≤ 1000 metros (0)	19 (11)	9 (11)	0,859
> 1000 metros (1)	157 (89)	71 (89)	
Eliminación de cadáveres			
Composta (0)	154 (88)	72 (90)	0,360
Otro (1)	22 (12)	8 (10)	
Control de moscas			
No (0)	126 (72)	55 (69)	0,446
Si (1)	50 (28)	25 (31)	
Control de roedores			
No (0)	10 (6)	2 (3)	0,096
Si (1)	166 (94)	78 (97)	
Registro foliado			
No (0)	167 (95)	76 (95)	0,950
Si (1)	9 (5)	4 (5)	
Enfermedades previas			
No (0)	141 (80)	66 (83)	0,469
Si (1)	35 (20)	14 (17)	
Desinfección del agua			
No (0)	78 (44)	35 (44)	0,890
Si (1)	98 (56)	45 (56)	
Análisis del agua			
No (0)	77 (44)	36 (45)	0,760
Si (1)	99 (96)	44 (55)	
Presentación del alimento			
Pellet (0)	174 (99)	79 (99)	0,897
Otro (1)	2(1)	1 (1)	
Desinfección del alimento			
No (0)	86 (49)	44 (55)	0,137
Si (1)	90 (51)	36 (45)	
Acidificantes en el alimento			
No (0)	94 (53)	43 (54)	0,934
Si (1)	82 (47)	37 (46)	

Continuación de la Tabla 48.

Variable	Números de galpones para cada categoría (%)	Números de galpones positivos a <i>Salmonella</i> spp. (%)	Valor p
Probióticos en el alimento			
No (0)	163 (93)	73 (91)	0,528
Si (1)	13 (7)	7 (9)	
Tiempo de almacenamiento alimento			
< 3 días (0)	103 (59)	53 (66)	0,058
≥ 3 días (1)	73 (41)	27 (34)	
Línea genética aves			
Cobb (0)	99 (56)	46 (58)	0,760
Otras (1)	77 (44)	34 (42)	
Cantidad de aves			
< 10.000 (0)	90 (51)	34 (42)	0,036
≥ 10.000 (1)	86(49)	46 (58)	
Tipo de comedero			
Automático (0)	90 (51)	43 (54)	0,527
Manual (1)	86(49)	37 (46)	
Tipo de bebedero			
Niple (0)	153 (87)	75 (94)	0,014
Otro (1)	23 (13)	5 (6)	
Edad de las aves			
< 37 días (0)	82 (47)	37 (46)	0,934
≥ 37 días (1)	94 (53)	43 (54)	
Medicación			
No (0)	159 (90)	72 (90)	0,889
Si (1)	17 (10)	8 (10)	
Vacuna contra <i>Salmonella</i> spp.			
No (0)	170 (97)	79 (99)	0,150
Si (1)	6 (3)	1(1)	
Material de la cama			
Cáscara de arroz (0)	143 (81)	65 (81)	1,000
Aserrín y otros (1)	33 (19)	15 (19)	
Características del galpón			
Automático (0)	91 (52)	45 (56)	0,271
Manual (1)	85 (48)	35 (44)	
Lateral del galpón limpio			
No (0)	7 (4)	4 (5)	0,526
Si (1)	169 (96)	76 (95)	
Lateral del galpón con malla			
No (0)	6 (39)	3 (4)	0,820
Si (1)	170 (97)	77 (96)	
Mortandad acumulada			
< 4 % (0)	103 (59)	44 (55)	0,387
≥ 4 % (1)	73 (41)	36 (45)	

Tabla 49. Resultado del análisis multivariado para la identificación de los factores de riesgo ($p < 0,05$) para la presencia de *Salmonella* spp. en galpones de granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos

Variable	Valor p
Nº de galpones < 5 galpones (0) ≥ 5 galpones (1)	0,062
Control de roedores No (0) Si (1)	0,188
Desinfección del alimento No (0) Si (1)	0,494
Tiempo de almacenamiento alimento < 3 días (0) ≥ 3 días (1)	0,132
Cantidad de aves < 10.000 (0) ≥ 10.000 (1)	0,125
Tipo de bebedero Niple (0) Otro (1)	0,119
Vacuna contra <i>Salmonella</i> spp. No (0) Si (1)	0,073

4. DISCUSIÓN

4.1. PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP. Y DE LOS SEROVARES ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM

En el presente estudio se recolectaron diferentes tipos de muestras (alimento balanceado, hisopados de cama y aves muertas en granjas de pollos parrilleros y alimento balanceado, aves muertas, hisopado cloacal, huevo y guano para granjas de gallinas de postura) con el fin de estimar la prevalencia de *Salmonella* spp. y conocer las serovariedades en estos tipos de muestras en la zona de mayor densidad de granjas pollos parrilleros y gallinas de postura de la provincia de Entre Ríos. Considerando que una granja es positiva cuando se aísla *Salmonella* spp. en al menos una muestra, en este trabajo el 62 % (58 granjas positivas a *Salmonella* spp. sobre un total de 93 granjas) de las granjas de pollos parrilleros fueron positivas a esta bacteria. Además, de las 58 granjas positivas a *Salmonella* spp., en 26 de ellas se aisló este patógeno en dos tipos de muestras. El hisopado de arrastre presentó mayor porcentaje de positivos con un 52 %, seguido por las muestras de alimento con un 30 % y por último se aisló *Salmonella* spp. en 7 % de granjas en la que se encontraron aves muertas. Estos resultados son mayores a los encontrados por Marin *et al.* (2011) en España, donde sólo el 33,9 % y el 16 % de las muestras fueron positivas a *Salmonella* spp. en muestras de hisopado de cama y de alimento, respectivamente, en ambos casos el mayor porcentaje de aislamiento se encontró en las muestras de hisopado de cama. En Argentina, durante el año 2009 a 2011, el SENASA (2012), utilizando, de igual manera que en este trabajo de tesis, calzas para muestrear la cama de pollo en los galpones, estimó que la prevalencia de *Salmonella* spp. móviles en granjas avícolas de pollos parrilleros de empresas, que destinan parte de su producción para exportación a la Unión Europea y a otros destinos fue de 45 %. A su vez, Genta (2013) encontró que el 42,4 % de las granjas fueron positivas a *Salmonella* spp., analizando muestra de cama y alimento en granjas de pollos parrilleros de Entre Ríos. Ambos estudios encuentran porcentajes menores al encontrado en esta investigación, lo que podría deberse a que en este estudio de tesis se tomaron diferentes tipos de muestras de más de un galpón en las granjas muestreadas y que el mismo se realizó en la zona de mayor concentración de granjas de producción intensiva de la provincia de Entre Ríos.

Por su parte, en granjas de postura y del mismo modo considerando que una granja es positiva cuando se aísla *Salmonella* spp. en al menos una muestra, en este trabajo el 46 % (29 granjas positivas a *Salmonella* spp. sobre un total de 63 granjas) de las granjas fueron positivas a esta bacteria. Soria (2013), realizó un estudio similar en la provincia de Entre Ríos, entre los años 2011 y 2012, en el que se tomó muestras de 30 granjas, informando una prevalencia de 60 %, cuyo valor de prevalencia es superior al encontrado en este trabajo de tesis, lo cual pudo deberse a que se procesaron muestras de hisopado de ambiente, que fue el tipo de muestra con mayor porcentaje de positividad de *Salmonella* spp., y este tipo de muestra no fueron incluidas en este trabajo de tesis.

Por otro lado, según datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la prevalencia de granjas infectadas en ese país fue de 19,2 % (USDA, 2005). En realidad, al sumar diferentes tipos de muestra en el análisis de *Salmonella* spp. se incrementa la probabilidad de detección del patógeno, como demostraron otros autores (Pieskus *et al.*, 2008; Soria, 2013).

Van Hoorebeke *et al.* (2010) encontraron 29 (9,9 %) granjas positivas a *Salmonella* spp. para distintos países de Europa, sobre un total de 292 granjas muestreadas, considerando solamente muestras de hisopados cloacales y materia fecal. Si se considera este tipo de muestras en este trabajo de tesis, la prevalencia de granjas positivas para *Salmonella* spp. en estas muestras fue de 2 y 25 % para hisopados cloacales de aves vivas y guano, respectivamente. La reglamentación de la Unión Europea (Reglamento UE, 2019) para el monitoreo de *Salmonella* spp. en aves ponedoras recomienda la recolección de guano fresco. Las muestras de guano (especialmente frescas) indican una infección reciente (Carrique-Mas y Davies, 2008). Schulz *et al.* (2011) señalaron que el bajo número de hisopados cloacales positivos probablemente esté influenciado por la baja prevalencia de aves que en un determinado momento se encuentran eliminando el patógeno a través del guano, aun cuando el ambiente se encuentre contaminado en el mismo momento de la toma de muestras. Carrique-Mas y Davies (2008) señalaron, que, durante la vida de un lote infectado, normalmente *Salmonella* spp. es excretada de manera intermitente por una pequeña proporción de aves. Por otro lado, El-Tras *et al.* (2010) informaron que la cloaca de las aves es un sitio de colonización importante y juega un rol en la posterior infección del huevo. Por ello, la recolección de pequeñas muestras de guano de varios sitios del galpón, mezcladas en una muestra conjunta, aumenta las chances de incluir guano con un alto número de *Salmonella* spp., ya que compensa la baja prevalencia de esta infección que usualmente se registra a nivel individual. La vigilancia ambiental es una herramienta útil para predecir las infecciones de las aves con *Salmonella* paratifoideas, que son los serotipos de *Salmonella* spp. causantes de las enfermedades transmitidas por los alimentos (Gast y Porter, 2020). Distintos autores (Im *et al.*, 2015, Soria *et al.*, 2017) encontraron que la colección de polvo y guano eran necesarias para mejorar la detección de *Salmonella* spp. en granjas de gallinas ponedoras. Sin embargo, no se debería dejar de lado el hecho de tomar muestras provenientes de hisopados cloacales, sobre todo cuando se detectan individuos enfermos o debilitados.

La persistencia de *Salmonella* spp. en el ambiente de la granja crea continuamente oportunidades de infección en las aves y esta situación puede agravarse frente a distintos tipos de estrés ambiental, tales como falta de alimento o agua (Gast *et al.*, 2013). El desarrollo de *Salmonella* spp. dentro de los huevos es consecuencia de la invasión de los tejidos reproductivos, aunque altas frecuencias de aislamiento en los órganos reproductivos no necesariamente aseguran altas frecuencias de contaminación en el huevo (Gast *et al.*, 2011b). Distintos trabajos experimentales sobre granjas positivas a *Salmonella* spp. mostraron que se aisló esta bacteria en muestras ambientales o de órganos de los animales, pero la frecuencia de aislamiento de este patógeno en cáscara o contenido de huevo fue baja (García *et al.*, 2011, Gast *et al.*, 2013). Los resultados de

este trabajo de tesis indicaron que si bien el porcentaje de granjas positivas sobre el total de granjas fue alto, solo se aisló *Salmonella* spp. en huevo (tanto de cáscara como de contenido) de 4 y 2 granjas en muestras de huevo fresco y huevos que fueron analizados luego de 15 días, respectivamente.

Debido a que las materias primas utilizadas para la elaboración de los alimentos balanceados destinados a las aves son productos secos con baja actividad de agua, los métodos de aislamiento para *Salmonella* spp., deben ser efectivos para poder recuperar la capacidad de multiplicación de las células bacterianas estresadas y deshidratadas (Koyuncu y Haggblom, 2009). Además, la contaminación con *Salmonella* spp. no es uniforme, dificultando aún más la detección (Jones y Richardson, 2004). A su vez, los alimentos destinados a los pollos parrilleros a menudo son tratados térmica o químicamente, para disminuir la contaminación por *Salmonella* spp. (Matlho *et al.*, 1997). De todas maneras, el tratamiento térmico no tiene un efecto residual, si no se implementa otra medida, la re-contaminación puede ocurrir durante el transporte o en la misma granja (EFSA, 2008). En este trabajo de tesis 28 y 11 granjas de pollos parrilleros y gallinas de postura tuvieron 1 o más muestras positivas a *Salmonella* spp. en la muestra de alimento balanceado, respectivamente. Sin embargo, la tasa de aislamiento considerando individualmente las muestras de alimento fue del 15 % (46 de 315) y 10 % (23 de 231) en las granjas de pollos parrilleros y gallinas de postura, respectivamente. La baja tasa de aislamiento podría explicarse por el tratamiento térmico mencionado anteriormente, aun cuando se utilizó el caldo tripteína de soja adicionado con hierro como medio para recuperar células dañadas. Por otro lado, si se hubieran procesado menos submuestras por galpón, la tasa de aislamiento de *Salmonella* spp. podría haber sido menor a la encontrada en este trabajo. Esto demuestra la importancia de procesar 6 submuestras por galpón.

En nuestro estudio, cuatro granjas fueron positivas a SG en muestras de huevo y aves muertas, aunque fueron negativas en el resto de las muestras. Como se indicó en el capítulo anterior, las técnicas que se utilizan en guano pueden subestimar la presencia de esta biovariedad a la hora de definir una granja libre de *Salmonella* spp. Por lo tanto, no se puede descartar que el foco de contaminación en estas granjas se encuentre en el ambiente, aun cuando se postula que SG se transmite principalmente vía vertical (Barrow y Freitas Neto, 2011). Davila Moran y Cruz (2022) indicaron que esta bacteria puede sobrevivir durante mucho tiempo en el medio ambiente y en las instalaciones para las aves para producir la recurrencia de la enfermedad. Si bien esta bacteria no tiene implicancia en salud pública, el hallazgo de esta enfermedad presenta gran importancia en términos económicos debido a las pérdidas que ocasiona a la producción avícola. En muchos países, la tifosis aviar es una enfermedad de denuncia obligatoria, pero en la práctica los datos oficiales relacionados con la misma son escasos, debido a que la enfermedad no es informada y por lo tanto su incidencia real está subestimada (Barrow y Freitas Neto, 2011). Las granjas positivas a SG fueron detectadas sólo a través del análisis de aves muertas y muestras de huevos, y, si no se hubiera tenido en cuenta esos

tipos de muestras, la presencia de esta biovariedad podría haberse subestimado en lotes con aves portadoras aparentemente sanas. A su vez, se aislaron otros serotipos de *Salmonella* spp., Schwarzengrund en hisopado de cama y Sarajane, Anatum, Mbandaka, Montevideo y Cerro en alimento balanceado. Del mismo modo, Terzolo (2011) señala que en la mayoría de los países de Latinoamérica a veces se presentan problemas combinados de tifosis causadas por SG y paratífosis causadas por SE u otra serovariedad móvil, por lo que la presencia de la primera no asegura que los establecimientos se encuentren libres de otras *Salmonella* paratíficas.

Andrews (2023) señaló que cualquier método empleado para recuperar microorganismos subletalmente dañados debería incluir una etapa de reparación, a través de la cual las células bacterianas pueden recuperar su estado fisiológico antes de ser sometidas al cultivo en un medio de enriquecimiento, que requiere una adaptación previa de la bacteria desde un estado estacionario al desarrollo exponencial en un medio rico en nutrientes. Durante el presente trabajo de tesis, las muestras de hisopado de cama y alimento fueron preenriquecidas en APT y CTS-Fe, respectivamente. Algunos medios de cultivo de preenriquecimiento recomendados para el aislamiento de *Salmonella* spp. incluyen agua peptona tamponada (APT) y CTS (Gast y Porter, 2020). Cogan *et al.* (2001) reportaron que el hierro en forma de sulfato ferroso promueve el crecimiento de las bacterias Gram-negativas cultivadas a partir de muestras de huevo. Además, señalaron que adicionando 35 mg/l de sulfato ferroso en caldos no selectivos se promueve el aislamiento de *Salmonella* spp. en huevo crudo. Por otro lado, existen algunas sustancias presentes en el alimento, tales como el ácido fítico, que son capaces de unirse al catión ferroso haciéndolo insoluble y por lo tanto no disponible como factor nutricional (Bohn *et al.*, 2008). Por ello, Soria *et al.* (2013) estudiaron el uso de CTS-Fe en la recuperación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos contaminadas artificialmente con esa bacteria, obteniendo resultados muy satisfactorios, lo que significó su incorporación en la metodología de este trabajo de tesis.

Los serotipos de *Salmonella* spp. que se pudieron determinar en las granjas de pollos parrilleros fueron variables. Los 5 serovares más prevalentes en las muestras fueron SE, S. ser. Anatum, S. ser. Tennessee, S. ser. Schwarzengrund, y S. ser. Rissen. Si bien no se encontraron en la bibliografía estudios similares actualizados en la zona de mayor concentración de granjas avícolas en la provincia de Entre Ríos, se puede decir que los datos encontrados en este estudio no concuerdan con la predominancia de los serovares reportados por SENASA (2012) en muestras de hisopado de cama, donde predominaron S. ser. Heidelberg (26,6 %), S. ser. Thompson (16,7 %), S. ser. Schwarzengrund (13,4%), S. ser. Senftenberg (6,6 %), y S. ser. Mbandaka (5,1 %), siendo que ST y SE participaron con el 2,6 % de los aislamientos cada una. A su vez, Fagbamila *et al.* (2017) realizaron un muestreo en granjas de Nigeria tomando muestras de polvo, cama, heces, alimento y agua, encontrando que los serotipos más predominantes fueron S. ser. Kentucky, S. ser. Poona, S. ser. Elizabethville, S. ser. Larochelle y S. ser. Agama. Por otro lado, De Sousa *et al.* (2013) tomaron muestras de cama de pollo de engorde en

Brasil y los serovares encontrados fueron *S. enterica* subsp. *enterica* 4,5,12: R: -, *S. ser. Heidelberg* y *S. ser. Infantis*.

Los serotipos de *Salmonella* spp. que se determinaron en las granjas de gallinas ponedoras fueron también variables, los 6 serovares más prevalentes en las muestras de guano, alimento balanceado, huevo, hisopados cloacales de aves vivas y aves muertas fueron SE, *S. ser. Westhampton*, SG, *S. ser. Livingstone*, *S. ser. Tennessee* y *S. ser. Cerro*. Sin embargo, Soria *et al.* (2017) encontraron los serovares *S. ser. Mbandaka*, SE, *S. ser. Infantis* y *S. ser. Kentucky* en muestras de guano de granjas de gallinas en Entre Ríos, coincidiendo de este modo solo en el serotipo Enteritidis. Por otra parte, Im *et al.* (2015) informaron a *S. ser. Bareilly* (41,2 %), *S. ser. Mbandaka* (32,4 %) y *S. ser. Rissen* (17,6 %) con mayor frecuencia, serovares que no han sido frecuentemente encontrados en este trabajo de tesis.

Por otro lado, en este trabajo se analizaron 666 muestras de hígados de pollos parrilleros provenientes de los frigoríficos ubicados en los departamentos de Uruguay, Colón y Gualeguaychú, para calcular la prevalencia de *Salmonella* spp. Los resultados revelaron una tasa de prevalencia del 4,8 % lo que resulta sumamente relevante ya que no se conocen datos publicados previamente sobre la prevalencia de *Salmonella* spp. en hígados de pollo parrilleros en Entre Ríos. Se sabe que el estado microbiano de las menudencias, como los hígados, es un indicador de las prácticas de higiene en los mataderos (Kramer *et al.*, 2000). Se han encontrados tasas variables de incidencia de *Salmonella* spp. en hígados de pollos (Abdellah *et al.*, 2009; El-Aziz, 2013; Molla y Mesfin, 2003; Rodrigo *et al.*, 2006) en otros países (Marruecos, Etiopía, Egipto y Trinidad), que van entre 1 % y 40 %. La variación de la contaminación por *Salmonella* spp. en los hígados de pollo puede deberse a las diferencias en las técnicas de muestreo, el número de muestras estudiadas, la distribución de *Salmonella* spp. en un lote examinado, los métodos de detección empleados y la contaminación cruzada durante la producción, el procesamiento, la distribución y la comercialización minorista (Abu –Ruwaida *et al.*, 1994; Bryan y Doyle, 1995; Domínguez *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2001; Russell y Walker, 1997; Rusul *et al.*, 1996; Uyttendaele *et al.*, 1998).

En este trabajo de tesis se identificaron tres serovares en las muestras de hígado de pollo: *S. ser. Schwarzengrund*, SE y ST; siendo el primero el serotipo más prevalente. Otros estudios relacionados con hígados de pollo a partir de menudencias encontraron ST, *S. ser. Branderup*, *S. ser. Kiambu*, *S. ser. Newport*, *S. ser. Montevideo* y/o *S. ser. Heidelberg* (Abdellah *et al.*, 2009; El-Aziz, 2013; Molla y Mesfin, 2003; Rodrigo *et al.*, 2006). *S. ser. Schwarzengrund* se ha aislado de fuentes infecciosas en humanos y animales (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2013;). Este serotipo se asocia frecuentemente con la producción avícola, como pollos (Chen *et al.*, 2011) y gallinas ponedoras (Poppe *et al.*, 1991; Soria *et al.*, 2017). Por otro lado, el aislamiento de ST y SE en nuestro estudio indica la importancia para la salud pública de estos serovares en carne de pollo y productos avícolas contaminados. Este riesgo puede ser alto si la carne de pollo o las menudencias se

consumen poco cocinadas o hay contaminación cruzada en la cocina con *Salmonella* spp. durante la preparación de la comida (D'Aoust, 1989; Scott, 1996; Uyttendaele *et al.*, 1998).

La técnica de PCR ofrece un método rápido y confiable para la detección de *Salmonella* spp. y ha sido usada exitosamente para el diagnóstico de la presencia de bacterias patógenas en muestras ambientales (Moganedi *et al.*, 2007). En el presente trabajo de investigación, se evaluaron por PCR los aislados compatibles con *Salmonella* spp., SE y ST y coincidieron en el 100 % de los casos. De igual manera, en un trabajo realizado por Stefanovicová *et al.* (1998) evaluaron 209 colonias de *Salmonella* spp. mediante PCR y tuvieron resultados idénticos (100 %) a los de la identificación bioquímica y serológica, en términos de discriminación de cepas de *Salmonella* spp. de cepas que no son compatibles con el género *Salmonella* spp.

4.2. CAPACIDAD DISCRIMINATORIA DE LAS TÉCNICAS Y LOS MEDIOS DE CULTIVOS SÓLIDOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES

El tipo de muestra y, en especial, la composición de la microbiota acompañante, es de suma importancia en la eficiencia de un medio agarizado selectivo. El crecimiento de bacterias distintas a *Salmonella* spp. puede interferir la lectura de las placas, ya que las colonias de *Salmonella* spp. no siempre pueden ser diferenciadas de otras enterobacterias que tienen una morfología colonial similar (Busse, 1995). Petersen (1997) señaló que la combinación de dos medios agarizados distintos disminuye el número de resultados falsos negativos, aunque este procedimiento implique un costo extra. En el este estudio de tesis, al combinar dos medios de cultivos selectivos-diferenciales se observó entre muy buena a excelente concordancia para las muestras de hisopado de cama, guano, alimento balanceado, hisopado cloacal de aves vivas y en las muestras tomadas de aves muertas, sin diferencia estadística entre los mismos. Por lo que el número de resultados falsos negativos no tendrían diferencias entre los dos medios de cultivos selectivos-diferenciales utilizados. Sin embargo, en las muestras de huevos se encontró una concordancia ligera y muy buena para huevo y huevo 15 días, respectivamente.

En el agar XLD, el desoxicolato inhibe las bacterias coliformes y permite la dispersión de colonias de *Proteus* sp. La forma de acción del medio se basa en que la degradación a ácido de la xilosa, lactosa y sacarosa produce un viraje del medio a amarillo por el indicador rojo fenol. El tiosulfato y el citrato férrico revelan la formación de ácido sulfhídrico por la precipitación de sulfuro de hierro en las colonias; esta reacción es inhibida en condiciones ácidas. La descarboxilación de la lisina en ausencia de fermentación de lactosa o sacarosa, ocasiona la reversión del medio hacia la alcalinidad y la colonia se mantiene roja (Zimbro *et al.*, 2009). A su vez, el XLDT tiene el agregado de tergitol que inhibe la microbiota Gram-positiva y numerosas cepas Gram-negativas, en particular *Proteus* sp (Yuña *et al.*, 1995; Chacana y Terzolo, 2003). Por su parte, el agar HE pertenece al grupo que tienen sales biliares. King y Metzger (1968) formularon este

medio, de cultivo que dispone de dos sistemas de indicadores de la fermentación de carbohidratos (azul de bromotimol y fucsina ácida) y citrato de hierro como indicador de la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato. Por su parte, el agar EF-18 es altamente selectivo y contiene sales biliares, violeta cristal, sulfapiridina y novobiocina. Las propiedades diferenciales son conferidas por la presencia de sacarosa y lisina, y las colonias de *Salmonella* spp. aparecen de color azul verdoso (Waltman, 2000). A pesar de que Warburton *et al.*, (1994) encontraron problemas con el uso de este medio para el aislamiento de *Salmonella* spp., debido al tamaño de la colonia, la coloración anormal y el crecimiento excesivo por la competencia, en este trabajo de tesis se encontró que el agar EF-18 tuvo una muy buena concordancia con el agar XLDT para el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de muestras de alimento, ambos con valores altos de SeR, ExaR, y VPNR, pero con diferencias estadísticas favorables al XLDT en los dos primeros.

En las muestras provenientes de aves muertas se encontró concordancia débil y nula para las muestras de hisopado cloacal y pool de ciegos, respectivamente. Los agares MC y SS mostraron valores altos ExaR y VPNR, pero valores variables de SeR. Resultados similares fueron encontrados por Soria *et al.* (2023), quienes estudiaron el aislamiento de SG en muestras de órganos de gallinas de postura enfermas con tifosis aviar que fueron sacrificadas. El agar SS es una modificación del agar citrato desoxicolato descrito por Leifson en 1935. Se lo considera un medio moderadamente selectivo según el nivel de inhibición de los microorganismos Gram positivos a los cuales inhibe por el contenido de sales biliares, verde brillante y citratos. Por otro lado, se considera que el agar MC es menos inhibidor. Cox *et al.* (1972) evaluaron el desempeño del agar SS en muestras de guano de aves de corral, encontrando un 41,6 % de muestras positivas, siendo el más alto comparado con otros medios de cultivo. En las muestras de bazo e hígado de este estudio de tesis la microbiota acompañante no representaría ningún problema cuando las muestras fueron sembradas sobre los agares SS o MC, medios de cultivo que tuvieron altos valores de SeR, ExaR y VPNR, por lo que se considera que son adecuados para este tipo de muestras. En el único caso que la SeR fue mayor en agar MC que en SS fue en las muestras de hisopado cloacal, quizás debido a la menor selectividad del medio.

En referencia al método de detección, la efectividad relativa de dos métodos de cultivo y agares selectivos diferenciales para el aislamiento de *Salmonella* spp. de hígado de pollo naturalmente contaminado se comparó en este trabajo. Se encontró una mala concordancia entre los dos métodos de cultivo, y que el método de preenriquecimiento tuvo valores de RSe, RAc y RNPV más altos que el método de inoculación directa sobre agar selectivo-diferencial. Aunque Valentin-Bon *et al* (2003) utilizaron diferentes medios selectivos-diferenciales, encontraron que el método de preenriquecimiento proporcionaba una mayor sensibilidad para el aislamiento de SE en el guano que se encontraba sobre huevos que el método de inoculación directa sobre un agar selectivo-diferencial. Es bien sabido que los patógenos tienen que competir con la microbiota autóctona, que está presente en las muestras, y ésta puede interferir en el momento de la prueba. El enriquecimiento secuencial en medios no selectivos y selectivos permite mejorar la

detección y la recuperación de *Salmonella* spp. lesionadas subletalmente, así como también aumentar el número de células (Chen *et al.*, 2001; Stephenson *et al.* 1991; Van Schothorst y Van Leusden, 1975). *Salmonella* spp. puede estar presente en el hígado de pollo en cantidades tan pequeñas que no pueden detectarse por el método directo. Además, el método de preenriquecimiento estudió la presencia de *Salmonella* spp. en todo el órgano (interno y externo), mientras que el método de inoculación directa lo hizo solo la parte interna de los hígados. Los resultados informados aquí son consistentes con aquellos estudios sobre el uso de preenriquecimiento y enriquecimiento directo para la recuperación de patógenos transmitidos por alimentos (D'Aoust *et al.*, 1992; Hammack *et al.*, 1999; Powrie y Nakai, 1986; Stephenson *et al.*, 1991).

Los medios agarizados utilizados para el aislamiento eficaz de las *Salmonella* spp. deben ser selectivos y tener un sistema indicador confiable para revelar la presencia de colonias de *Salmonella* spp. Estas propiedades deben ser estables durante el tiempo de almacenamiento y uso del medio (Rappold y Bolderdijk, 1979). En este trabajo para el caso de los hígados para consumo, los mejores resultados se obtuvieron con MLIA. Edwards y Fife (1961) introdujeron este medio para detectar la descarboxilación de lisina y la producción de H₂S de *Salmonella* ser. Arizona. Además, se agregó novobiocina, sales biliares, lactosa y sacarosa para mejorar la selectividad y la capacidad de diferenciación del agar lisina hierro. La diferenciación de enterobacteriaceae en MLIA se basa en un cambio de color de púrpura a amarillo si la lisina no se descarboxila y la lactosa, la sacarosa o ambas se fermentan. *Salmonella* spp. descarboxila la lisina y no fermenta la lactosa ni la sacarosa; se mantiene el color púrpura del medio. *Salmonella* spp. positiva para H₂S crecen con colonias con centro negro. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) enumera MLIA como parte de la diferenciación y confirmación de *Salmonella* spp., pasos que comienzan con la inoculación en agar sulfa verde brillante agar y MLIA o Xilosa-Lisina Tergitol™ 4 agar (USDA, 2017). Así también, Rappold y Bolderdijk (1979) encontraron que MLIA aumentaba la tasa de aislamiento de *Salmonella* spp. de cultivos mixtos de diferentes enterobacteriaceae si se comparaba con otros agares selectivos-diferenciales (agar verde brillante, agar desoxicolato lactosa, agar *Salmonella-Shigella*, agar entérico Hektoen y agar xilosa-lisina desoxicolato).

4.3. FACTORES DE RIESGOS PARA *SALMONELLA* SPP. EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS Y POLLOS PARRILLEROS

En este estudio no se pudo asociar ningún factor de riesgo al aislamiento de *Salmonella* spp. en granjas de pollos parrilleros de la zona de mayor densidad de granjas en la provincia de Entre Ríos. De todas formas, de acuerdo a las encuestas realizadas se encontró que la mayoría de los establecimientos de pollos parrilleros y gallinas de postura mantenían otras especies animales en estrecho contacto con las aves, ya sea como mascotas o para cumplir otras funciones en las granjas. La resolución 542/2010 (hoy cambiada por la resolución 1699/2019; SENASA, 2019) no permite la presencia de

animales distintos de las aves de producción dentro de la granja. En el relevamiento se encontró la presencia de otras aves, cerdos, bovinos, ovinos, perros y/o gatos en las granjas examinadas, es decir, animales que ponen en riesgo el estado sanitario de las aves de la granja. Se conoce que los animales domésticos suelen convertirse en portadores asintomáticos de una infección latente, aunque sólo rara vez manifiestan clínicamente la enfermedad, representando de ese modo un reservorio y una fuente importante de contaminación ambiental para las aves (Omwandho y Kubota, 2010). Por ello, es necesario realizar una concientización en los productores en todo lo referente a la tenencia de otras especies animales en la misma granja de aves, pues, de esta manera, se podría disminuir la probabilidad de presentación de brotes infecciosos y las consiguientes pérdidas económicas.

Otro aspecto de la legislación establece que todas las prácticas que se realicen con fines de higiene y bioseguridad (limpieza, desinfección, control de ingreso de personas y vehículos u otros) deben ser documentadas por escrito en un libro foliado o manual de buenas prácticas (SENASA, 2019). En este trabajo se determinó que la gran mayoría de las granjas visitadas de pollos parrilleros no contaba con este registro. A la hora de atender un problema sanitario o productivo, así como en el momento de realizar cualquier análisis sobre la realidad de un establecimiento, es preciso contar con información confiable, tanto histórica como actual (Venturino, 2006). En este punto radica la importancia de los registros.

Por otro lado, la cantidad de crianzas con la misma cama es un aspecto a tener en cuenta, si bien en este trabajo la mayoría de las camas eran utilizadas 3 veces o menos, Roll *et al.* (2011) estudiaron la presencia de esta bacteria en camas de pollos parrilleros reutilizadas hasta 14 veces en Brasil, estos autores encontraron una significativa disminución en la presencia de muestras positivas a *Salmonella* spp. con el reuso de cama. A la vez, estos resultados se verían influenciados por los tiempos de descanso entre crianzas, donde SENASA fija 10 días para dicha práctica, los cuales pueden aumentarse en función del tipo de producción (reproducción, engorde o producción de huevos), el tamaño del establecimiento, la incidencia de enfermedades o patologías que se presenten y el historial de mortandad de los lotes anteriores (SENASA, 2019).

Para economizar costos, la producción avícola tiende a desarrollarse en áreas geográficas específicas o limitadas, lo cual ocasiona que las poblaciones de aves se tornen cada vez más densas. Esto tiene muchas ventajas en lo concerniente a la disminución de los costos del transporte de alimentos, lotes, drogas, vacunas o del personal de los equipos de supervisión. Sin embargo, estas áreas de producción avícola densamente pobladas presentan un desafío para la industria cuando se decide limitar sus efectos adversos o reducir la persistencia de enfermedades importantes (Pattinson, 2008). En la provincia de Entre Ríos, la producción avícola de pollos parrilleros se concentra en la costa del Uruguay, en especial en los departamentos de Uruguay, Colón y Gualaguaychú, siendo que el primero concentra el 51 % de la producción de la provincia (Schell *et al.*, 2011), pero esta división no resultó un factor de riesgo para la presencia de

Salmonella spp. en las 93 granjas muestreadas en este trabajo de tesis. Sin embargo, en la misma provincia, la producción avícola de gallinas ponedoras se concentra en los departamentos de Paraná y Diamante, siendo que el departamento Paraná agrupa la mayor parte de la producción (Schell *et al.*, 2011, Lamelas *et al.*, 2011, Martínez y Borghello, 2019). Ésta división resultó ser un factor de riesgo para la presencia de *Salmonella* spp. en las 63 granjas muestreadas dando razón de probabilidades de 9,5. Por lo tanto, los galpones de las granjas de gallinas de postura que se encontraban en el departamento de Paraná presentaron 9,5 veces más riesgo de presencia de *Salmonella* spp. que aquellos que se encontraban en el departamento de Diamante.

Tanto los roedores como las moscas también fueron asociados con la presencia de *Salmonella* spp. en las granjas (Mollenhorst *et al.*, 2005). Bouzidi *et al.*, (2012) informaron que la presencia de roedores vivos o muertos dentro del galpón podría influenciar la contaminación con esta bacteria, ya que estos animales representan una fuente potencial del patógeno. La mayoría de las granjas estudiadas en este trabajo de tesis realizaban controles periódicos de moscas y roedores; lo que pudo haber disminuido la probabilidad de contaminación de los animales con *Salmonella* spp.

En este trabajo de tesis, se pudo asociar como factor de riesgo el tipo de maple utilizado, debido a que los galpones que utilizaban maples de cartón poseían 6,2 veces más probabilidades de tener *Salmonella* spp. con respecto a aquellos que utilizaban maples tanto de cartón y de plástico. Esto puede deberse a que la contaminación en el lugar de envasado es un factor importante en la contaminación externa de la cáscara (Messens *et al.*, 2006). Viora *et al.* (1993) encontraron que 50 de 100 muestras de maples, que habían sido utilizados en las granjas, estaban contaminadas con SE. Soria (2012) investigó la presencia de *Salmonella* spp. en 452 muestras de maples, encontrando sólo 5 muestras positivas; los serotipos encontrados fueron S. ser. Muenchen, S. ser. Westhampton, S. ser. Agona y SE. Por otro lado, Humprey *et al.* (1991a) demostraron que la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* spp. varía con la edad de las aves. Namata *et al.* (2008) identificaron que existe un mayor riesgo de contraer *Salmonella* spp. a medida que las gallinas envejecen y aumenta el tamaño de las aves. Aunque Soria (2013) no encontró asociación de la edad de las aves con la presencia de *Salmonella* spp. en gallinas de postura, en este trabajo de tesis se encontró que es 8,2 veces más probable tener *Salmonella* spp. en galpones de más de 80 semanas de edad.

5. CONCLUSIONES

5.1. PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP. Y DE LOS SEROVARES ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM

- ✓ La prevalencia de *Salmonella* spp. en la zona de mayor concentración de granjas de pollos parrilleros de Entre Ríos, Argentina es del 62 % considerando distintos tipos de muestras a la vez, siendo el hisopado de cama la mejor muestra para el aislamiento de esta bacteria.
- ✓ El serotipo de *Salmonella* spp. más prevalente en la zona de mayor concentración de granjas de pollos parrilleros de Entre Ríos, Argentina, es el Enteritidis con un 13 %.
- ✓ La prevalencia de *Salmonella* spp. en la zona de mayor concentración de granjas de gallinas ponedoras de Entre Ríos, Argentina es del 46 % considerando distintos tipos de muestras a la vez.
- ✓ El serotipo de *Salmonella* spp. más prevalente en la zona de mayor concentración de granjas de gallinas ponedoras de Entre Ríos, Argentina es el Enteritidis con un 14%.
- ✓ Al considerar una granja avícola como positiva cuando en al menos una muestra se aisló *Salmonella* spp., determina que la combinación de varios tipos de muestra aumenta el valor de la prevalencia en la zona de mayor concentración de granjas.
- ✓ La prevalencia de *Salmonella* spp. es del 4,8 % en hígados de pollos relacionado a frigoríficos de Entre Ríos, Argentina.
- ✓ Se aislaron serotipos Enteritidis y Typhimurium en hígados de pollos relacionado a frigoríficos de Entre Ríos, Argentina lo que implica un riesgo para la salud pública.

5.2. CAPACIDAD DISCRIMINATORIA DE LAS TÉCNICAS Y LOS MEDIOS DE CULTIVOS SÓLIDOS SELECTIVOS-DIFERENCIALES EMPLEADOS EN EL AISLAMIENTO DE *SALMONELLA* SPP.

- ✓ El agar XLDT es superiores al EF-18 para la recuperación de *Salmonella* spp. de muestras de alimento balanceado en granjas de pollos parrilleros de Entre Ríos, Argentina, mientras que el agar MC se comporta igual que el agar SS para aislar *Salmonella* spp. en muestras de órganos de las aves.
- ✓ Los valores de Se_r , EXA_r , Esp_r , VPP_r y VPN_r de los medios cultivos sólidos selectivos-diferenciales utilizados en este estudio son altos y no presentan diferencias entre ellos para las muestras de galpones de gallinas de postura.

- ✓ El método de preenriquecimiento es superior al método de inoculación directa en agar selectivo-diferencial para aislar *Salmonella* spp. en muestras de hígado de pollo.
- ✓ El agar MLIA es superior al MC para la recuperación de *Salmonella* spp. de muestras de hígado de pollo.

5.3. FACTORES DE RIESGOS PARA *SALMONELLA* SPP. EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS Y POLLOS PARRILLEROS EN LA ZONA DE MAYOR DENSIDAD DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS

- ✓ No se pudo asociar ningún factor de riesgo al aislamiento de *Salmonella* spp. en granjas de pollos parrilleros de la zona de mayor densidad de granjas en la provincia de Entre Ríos.
- ✓ La edad de las aves, el tipo de maple utilizado y la ubicación de las granjas son factores de riesgo para la presencia de *Salmonella* spp. en granjas de gallinas ponedoras de la zona de mayor densidad de granjas en la provincia de Entre Ríos.

CAPÍTULO 3

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR CEPAS DE *SALMONELLA* SER. ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS Y SU BIOCONTROL POR BACTERIAS LÁCTICAS

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados, bacterias planctónicas, de libre flotación y bacterias en biopelículas como colonias de microorganismos sésiles (Nazar, 2007). Una biopelícula es definida como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies protegidas por sustancias poliméricas extracelulares autogeneradas y fijadas a una superficie inerte o un tejido vivo (Navia *et al.*, 2010; Steenackers *et al.*, 2012). La formación de biopelículas por microorganismos representa un serio problema para los sectores industrial, de salud y de la producción de alimentos, ya que, es una fuente de contaminación microbiológica constante, debido a la dificultad para eliminarlas una vez formadas (De los Santos Villamil *et al.*, 2012).

Se considera que el 99 % de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelículas y tan sólo 1 % vive en estado planctónico (Nazar, 2007). La matriz extracelular de las biopelículas está constituida por una compleja red de estructuras llamadas sustancias poliméricas extracelulares, que está formada por un 97 % de agua y el resto está compuesto principalmente por exopolisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos (Castelijm, 2013). Las sustancias poliméricas extracelulares protegen a los microorganismos dentro de la biopelícula, contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, quelantes, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes, lo que ocasiona que sean muy difíciles de eliminar (Navia *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que *Salmonella* spp. tiene la habilidad de formar biopelículas en múltiples superficies abióticas fuera del hospedero, como en el plástico, la goma, el cemento, el vidrio y el acero inoxidable y es comúnmente encontrada en granjas, mataderos, cocinas, plantas procesadoras de alimento y baños (Steenackers *et al.*, 2012). Los parámetros ambientales físicoquímicos que influyen en la formación de biopelículas de *S. enterica* son múltiples, e incluyen la composición del medio, la temperatura de incubación, la osmolaridad, el pH y la atmósfera desempeñando un papel importante en el cambio fenotípico de las células planctónicas al estado sésil (Lianou y Koutsoumanis, 2012). Un aspecto muy importante de las biopelículas de *Salmonella* spp. en la producción avícola primaria es que pueden ser un reservorio potencial de este patógeno en las granjas y en las plantas de procesamiento de alimentos, avanzando así a través de la cadena alimentaria a través de la contaminación de los alimentos (Schonewille *et al.*, 2012).

La matriz del biofilm de *Salmonella* spp. está compuesta por proteínas y exopolisacáridos, entre otras cosas. Hay dos proteínas principales relacionadas con las biopelículas. Curli, una fimbria amiloide y proteína BapA. Por otro lado, la celulosa y el ácido colónico son los principales exopolisacáridos de la matriz del biofilm. También las fimbrias tipo I, Lpf y Pef son importantes en los pasos iniciales de la formación de

biopelículas. Otros componentes como los ácidos grasos y los lipopolisacáridos también desempeñan un papel en la formación de biopelículas (Lamas *et al.*, 2021).

Para disminuir la prevalencia *Salmonella* spp. en las aves de corral, algunos estudios han investigado el uso de bacterias del ácido láctico y/o bacterias probióticas, que ofrecen una alternativa natural (Merino *et al.*, 2019; Giaouris, 2020; Mgomi *et al.*, 2023). En realidad, los probióticos se definieron como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped y muchas bacterias del ácido láctico se consideran probióticos (Hill *et al.*, 2014). Los microorganismos utilizados principalmente como probióticos en animales incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pedococcus*, *Bacillus*, aunque también se han utilizado algunas levaduras del género *Saccharomyces* (Gaggia *et al.*, 2010; Vandeplas *et al.*, 2010). Trabajos recientes han demostrado que ciertas cepas probióticas son capaces de reducir la formación de biopelículas por microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria* (Das *et al.*, 2013; Woo y Ahn, 2013; Chapman *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2016, Merino *et al.*, 2019; Merino *et al.*, 2019; Seo y Kang, 2020; Rusli *et al.*, 2023). Este efecto podría ser la adición de su capacidad de coagregarse con patógenos potenciales y/o producir sustancias antimicrobianas (como el peróxido de hidrógeno) y biotensioactivos que inhiben la adhesión bacteriana (Cadieux *et al.*, 2009). La hidrofobicidad de la superficie celular, la producción de sustancias poliméricas extracelulares, la presencia de algunas estructuras como fimbrias y flagelos y otras proteínas o polisacáridos influyen en la unión a las superficies (Donlan, 2002). Es por ello que resulta imprescindible conocer la capacidad de las cepas de *Salmonella* spp. para formar biopelículas e investigar si cepas de bacterias ácido lácticas pueden emplearse como una alternativa para disminuir la formación de biopelículas por parte de *Salmonella* spp.

Por lo tanto, los objetivos de este capítulo fueron:

- Determinar la producción de biopelículas en cepas de SE, ST y SG provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- Estudiar la capacidad de dos cepas de bacterias ácido lácticas y sus sobrenadantes de modificar la formación de biopelículas en cepas de SE y ST provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SER. ENTERITIDIS, *S. SER. TYPHIMURIUM* Y *S. SER. GALLINARUM* BIOVAR *GALLINARUM*

2.1.1. Cepas utilizadas

Se incluyeron un total de 169 cepas de *Salmonella* spp., aisladas de muestras de hisopado de cama, aves vivas y muertas, guano y huevos provenientes de granjas de pollos parrilleros (56), gallinas ponedoras (102) e hígados de pollos parrilleros (11), obtenidos de las zonas de mayor densidad de granjas de la provincia de Entre Ríos. Del total de cepas estudiadas, 105 correspondieron a SE, 14 a ST y 50 a SG (Tabla 50).

Tabla 50. Origen de las cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) y *S. ser. Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG) incluidas en los ensayos de producción de biopelículas

Granjas de pollos parrilleros				Granjas de gallinas ponedoras						Frigoríficos		
Hisopados de cama		Aves muertas		Guano		Aves muertas		Huevos		Hisopado cloacal aves vivas	Hígados de pollos parrilleros	
SE	ST	SE	SG	SE	ST	SE	SG	SE	SG	SE	SE	ST
27	10	3	14	25	2	26	35	11	1	2	5	1

2.1.2. Producción de biopelículas de cepas de *Salmonella* spp.

Para evaluar la producción de biopelículas de las cepas de *Salmonella* spp. se emplearon cuatro técnicas diferentes. En todos los casos se partió de un inóculo inicial con una concentración estandarizada en 0,5 en la escala de McFarland.

2.1.2.1. Tinción con cristal violeta en microplacas

Se utilizó la técnica propuesta por Stepanovic *et al.* (2000) con algunas modificaciones (**Figura 14**). La misma consistió en inocular, en placas de poliestireno con 48 pocillos, por triplicado 10 µl del cultivo de *Salmonella* spp. en un pocillo que contenía 490 µl de caldo LB sin NaCl (extracto de levadura 5,0 g/l, triptona 10,0 g/l; pH 7,2 ± 0,2), del mismo modo se realizó un control negativo (tres pocillos sin inocular) y un control positivo con la cepa SE 115, de comprobada capacidad de producción de biopelículas (Merino *et al.*, 2019). Estas placas fueron incubadas estáticamente a 28°C durante 48 h.

Posteriormente, se descartó el caldo con crecimiento, se realizó cuidadosamente evitando desprender la biopelícula formada en las paredes y base de los pocillos; a

continuación, se realizó un lavado con solución fisiológica estéril (NaCl 0,85 % m/v), el cual consistió en agregar 500 µl de solución fisiológica y descartar el líquido de la misma forma que se descartó el caldo. Después se dejó la placa abierta hasta que la misma se secó por completo. Para fijar la biopelícula formada, se agregó 500 µl de metanol por pocillo durante 10 min, transcurrido dicho tiempo se descartó el metanol y se dejó la placa abierta hasta que se evaporó por completo el metanol. Posteriormente, se realizó la tinción de la biopelícula adherida a las paredes y fondo de los pocillos, para lo cual se agregaron 500 µl de solución de cristal violeta (cristal violeta 1 % m/v) y, luego de transcurridos 30 minutos, se eliminó el cristal violeta y se realizaron tres lavados con solución fisiológica para eliminar el exceso del colorante. En este caso, también se dejó la placa abierta hasta que se secó por completo. Para disolver la biopelícula adherida y teñida se agregaron 500 µl de alcohol etílico 96°, durante al menos 15 min y por último se realizó la lectura en un lector de placas de ELISA a 595 nm (Biochrom EZ Read 800). Para ello, se tomaron 150 µl de la solución coloreada y se las transfirió a una microplaca de 96 pocillos y se efectuó la lectura. En los casos que la lectura excedió el rango del equipo, se realizaron las diluciones correspondientes. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Las cepas se clasificaron de acuerdo a la absorbancia medida (OD) comparándolas con la absorbancia crítica (OD_c) hallada para cada placa. Se definió la OD_c como tres desviaciones estándar por encima de la absorbancia media del control negativo. En base a esto, las cepas se clasificaron en

- $OD \leq OD_c$: no adherente
- $OD_c < OD \leq 2 OD_c$: débilmente adherente
- $2 OD_c < OD \leq 4 OD_c$: moderadamente adherente
- $\leq 4 OD_c < OD$: fuertemente adherente

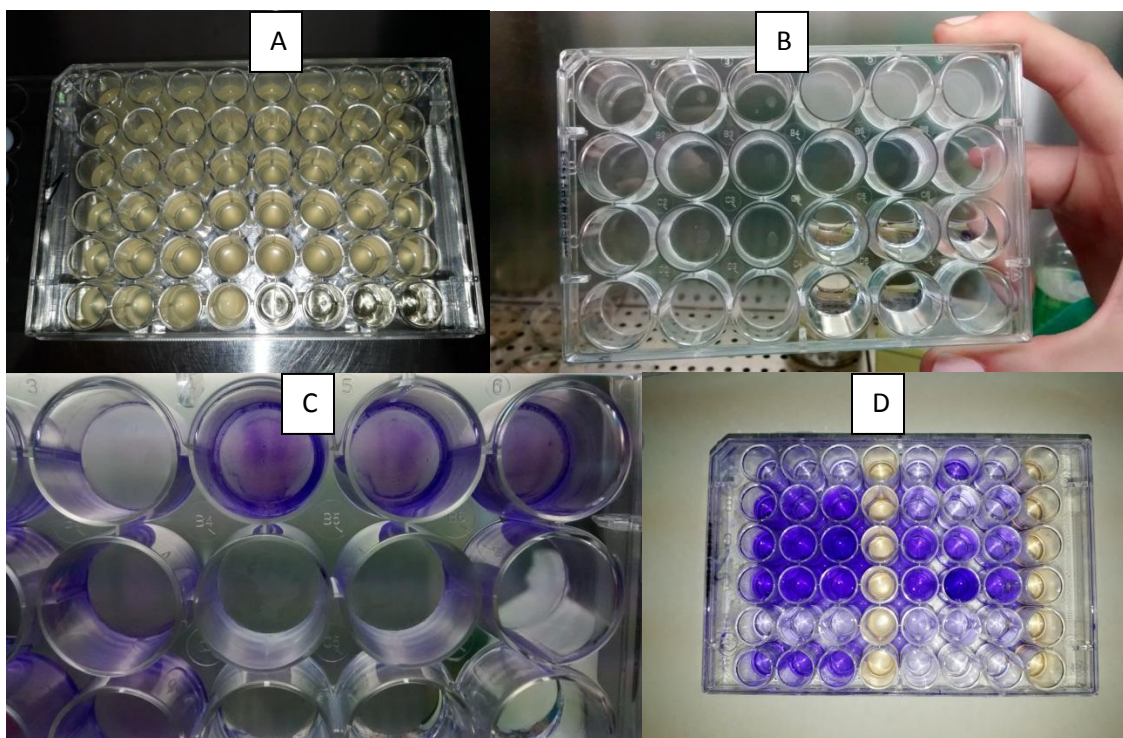


Figura 14. Etapas en la determinación biopelículas por la técnica de cristal violeta

A: microplaca con desarrollo de *Salmonella* spp. en caldo LB, sin NaCl; **B:** microplaca con desarrollo de biopelícula una vez eliminado el caldo LB, sin NaCl; **C:** microplaca con biopelícula, teñida con cristal violeta; **D:** microplaca con biopelícula teñida con cristal violeta resuspendida en una solución de alcohol etílico 96°.

2.1.2.2. Formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo

Para determinar visualmente la capacidad de formación de biopelícula de las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas se utilizó el método descrito por Weiss-Muszkat *et al.* (2010) y Aya-Castañeda *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se inocularon 0,5 ml del cultivo de las cepas de *Salmonella* spp. en tubos de ensayos que contenían 4,5 ml de caldo LB sin NaCl (extracto de levadura 5,0 g/l, triptona 10,0 g/l; pH $7,2 \pm 0,2$), que es un medio deficiente en nutrientes. Este ensayo se realizó por duplicado. Al mismo tiempo, se realizó un control negativo (tubos sin inocular) y un control positivo (cepa productora de biopelícula SE 115). Se incubó estáticamente a 28°C por 8 días. Los tubos fueron observados diariamente y se registró el tiempo en el que se hizo visual la biopelícula en la interfase líquido-aire (Latasa *et al.*, 2012).

2.1.2.3. Estudio de la producción de curli y celulosa por morfología de colonia en rojo congo

El ensayo se basó en el método descrito por Malcova *et al.* (2008) y Karaca *et al.*, (2013). Se inocularon las cepas de *Salmonella* spp. por agotamiento sobre superficie en agar LB sin NaCl (extracto de levadura 5,0 g/l, triptona 10,0 g/l agar 15 g/l; pH 7,2 ± 0,2), complementado con 40 µg/ml de rojo congo (Sigma, Saint Louis, MO) y 20 µg/ml azul de coomassie R250 (Sigma, Saint Louis, MO). Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 96 h. Posteriormente, se observaron las colonias aisladas determinando la morfología. Las inoculaciones se realizaron por duplicado y los morfotipos pudieron ser clasificados en 5 tipos diferentes de acuerdo al aspecto de las colonias (Malcova *et al.*, 2008; Karaca *et al.*, 2013). Los 5 morfotipos posibles fueron:

- RDAR: fenotipo rojo, seco y rugoso. Expresa curli fimbriae y celulosa;
- BDAR: fenotipo marrón, seco y rugoso. Expresa solo curli fimbriae;
- PDAR: fenotipo rosa, seco y rugoso. Expresa solo celulosa;
- SBAM: fenotipo liso, marrón y mucoide. Expresa sobreproducción de polisacárido; capsular y falta de síntesis de celulosa;
- SAW: fenotipo liso y blanco. No expresa curli ni celulosa.

2.1.2.4. Prueba de producto comercial “BioFinder”

Para evaluar la producción de biopelícula con el producto comercial denominado “BioFinder”, se inocularon 10 µl de los cultivos de *Salmonella* spp. en un pocillo que contenía 490 µl de caldo LB sin NaCl. Este ensayo se realizó por duplicado en placas de 48 pocillos. Del mismo modo, se realizó un control negativo (un pocillo sin inocular) y un control positivo (un pocillo con cepa productora de biopelícula *S. Enteritidis* 115). Las placas se incubaron estáticamente a 28°C durante 48 h. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se descartó el caldo con crecimiento, este proceso se realizó cuidadosamente evitando desprender la biopelícula formada en las paredes y base de los pocillos, posteriormente se realizó un lavado con solución fisiológica (NaCl 0,85 % m/v), el mismo consistió en agregar 500 µl de solución fisiológica y descartar el líquido de la misma forma que se descartó el caldo, después se dejó la placa abierta hasta que se secó por completo. Por último, se agregaron 500 µl del producto “BioFinder”, y se observó la producción de gas, lo que evidenció la inmediata formación de espuma blanca, considerándose como positivo aquellas cepas que mostraron este comportamiento.

2.1.3. Comparación de técnicas

Se evaluó la concordancia entre los resultados de las diferentes técnicas de detección de biopelículas mediante el uso del coeficiente kappa (Martin, 1977) y la prueba de McNemar (GraphPad Software, 2023). Según lo descrito en el Punto 2.1.9. del Capítulo 2.

2.2. CAPACIDAD DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) Y SUS SOBRENADANTES PARA MODIFICAR LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SER. ENTERITIDIS Y *S. SER. TYPHIMURIUM*

2.2.1. Cepas utilizadas

Por un lado, se incluyeron las cepas de *Salmonella* que resultaron ser moderada y fuertemente productoras de biopelículas en el ensayo en microplacas de 48 pocillos con la tinción con cristal violeta. De esta forma, fueron incluidos un total de 86 aislamientos de *Salmonella* spp.; 74 correspondieron a SE y 12 a ST. Las cepas fueron aisladas a partir de granjas de pollos parrilleros (40), gallinas ponedoras (37) e hígados de pollos parrilleros (9), obtenidos de las zonas de mayor densidad de granjas de la provincia de Entre Ríos. Por otro lado, se seleccionaron dos bacterias ácido lácticas (BAL) probióticas aisladas de kefir de la colección del CIDCA: *Lentilactobacillus kefir* CIDCA 8321 y *Lactiplantibacillus plantarum* CIDCA 83114. Ambas cepas demostraron tener propiedades inhibitorias contra *Salmonella* spp. y otros patógenos intestinales (Golowczyc *et al.*, 2007, 2008).

2.2.2. Efecto de las BAL sobre la formación de biopelículas de *Salmonella* spp.

El efecto inhibitor de las BAL sobre la formación de la biopelícula de las cepas de *Salmonella* spp. se determinó *in vitro* en microplacas de poliestireno de 48 pocillos. Se realizaron dos experimentos en paralelo, por un lado, utilizando la bacteria entera y, por el otro, el sobrenadante de crecimiento de las mismas. En ambos casos, se partió de inóculos de concentración estándar, los cuales se obtuvieron por crecimiento de los microorganismos hasta una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland en caldo triptéina de soja para las cepas de *Salmonella* spp., mientras que para las cepas de BAL se partió de un cultivo de toda la noche en caldo MRS (Acumedia-Neogen), en el cual las células fueron sedimentadas por centrifugación en una centrífuga de mesa a 302 x g durante 15 min a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). El sobrenadante se conservó y el sedimento se resuspendió en caldo LB (sin cloruro de sodio) hasta una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

2.2.2.1. Con las BAL enteras

En placas de poliestireno de 48 pocillos se colocó 0,5 ml de caldo LB sin cloruro de sodio por pocillo. Luego, por un lado, se añadieron 10 µl de la suspensión de cada BAL por separado y 10 µl del inóculo de las diferentes cepas de *Salmonella* spp. a cada pocillo y se incubaron durante 48 h a 28 °C en condiciones estáticas (coincubación). Paralelamente en otra placa, a cada pocillo que contenía 0,5 ml de caldo LB sin cloruro de sodio se le colocaron 10 µl de la suspensión de BAL y se incubaron durante 1 h a 28 °C en condiciones estáticas. A continuación, se añadió a cada pocillo 10 µl de suspensión de

Salmonella spp. y se incubó durante 48 h a 28 °C (preincubación). Del mismo modo por cada microplaca se colocó 0,5 ml de caldo LB sin cloruro de sodio como control negativo y, a su vez, como control positivo solamente las cepas de *Salmonella* spp. En ambos casos, se estudió la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. como se describió en el punto 2.1.2.1. “Tinción con cristal violeta en microplacas”. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

2.2.2.2. Con el sobrenadante de cultivo libre de células

En placas de poliestireno de 48 pocillos se colocó 0,5 ml de caldo LB sin cloruro de sodio en cada pocillo. Luego se añadieron 10 µl de la suspensión de las diferentes cepas de *Salmonella* spp. a cada pocillo y se incubaron durante 48 h a 28 °C en condiciones estáticas. Posteriormente se descartó el caldo y se colocó 0,5 ml del sobrenadante de cada BAL y se incubó durante 3 h a 28 °C en condiciones estáticas. Paralelamente, se colocó 0,5 ml de caldo LB sin cloruro de sodio por microplaca como control negativo y, a su vez, solamente las cepas de *Salmonella* spp. como control positivo. Posteriormente, se estudió la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. como se describió en el punto 2.1.2.1. “Tinción con cristal violeta en microplacas”. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

2.2.3. Análisis estadístico

Los resultados de las absorbancias se expresaron como la media y el desvío estándar. Las diferencias significativas asociadas a los diferentes tratamientos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional. La diferencia estadística se indicó en $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SER. ENTERITIDIS, S. SER. TYPHIMURIUM Y S. SER. GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS

3.1.1. Tinción con cristal violeta en microplacas

Los resultados de la cuantificación de la producción de biopelículas por medio de esta técnica se muestran en la **Tabla 51**. El 52 % de las cepas de *Salmonella* spp. resultaron ser adherentes, siendo el 47 % fuertemente y el 5 % moderadamente adherentes. El resto de las cepas de *Salmonella* spp. resultaron ser débilmente adherentes. Teniendo en cuenta la clasificación por serotipos el 71 % de las cepas de SE fueron adherentes, con 67 % fuertemente y 4 % moderadamente. Para el serotipo Typhimurium se encontró que la mitad de las cepas fueron fuertemente adherentes, y el 36 y 14 % resultaron ser moderadamente y débilmente adherentes. Por otra parte, el serotipo Gallinarum fue el serotipo que mostró mayor porcentaje de cepas débilmente adherente con un porcentaje del 96 %, siendo el 4 % restante fuertemente adherente.

Tabla 51. Cuantificación de la producción de biopelículas por medio de la técnica de tinción con cristal violeta en microplacas de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis, S. ser. Typhimurium y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum provenientes de granjas avícolas (ponedoras y ponedoras) e hígados de pollos parrilleros

Serotipos de <i>Salmonella</i> spp.	% (Nº de cepas positivas/Nº total de cepas ensayadas)		
	Fuertemente adherente	Moderadamente adherente	Débilmente adherente
Enteritidis	67 (70/105)	4 (4/105)	29 (31/105)
Typhimurium	50 (7/14)	36 (5/14)	14 (2/14)
Gallinarum biotipo Gallinarum	4 (2/50)	0 (0/50)	96 (48/50)
Total	47 (79/169)	5 (9/169)	48 (81/169)

3.1.2. Formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo

La formación de biopelícula se observó como una matriz completa alrededor del diámetro del tubo, mostrando en algunos casos una apariencia porosa y en otros casos una película irregular de apariencia gelatinosa. Los resultados de la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire se muestran en la **Tabla 52** en donde se observa que, de los tres serotipos, Gallinarum es el que mayor porcentaje de no productoras tiene,

con un 96 % de las cepas. A su vez, el 29 % y el 14 % de las cepas de Enteritidis y Typhimurium, respectivamente no produjeron película en la interfase líquido-aire. El 71 % y 86 % de las cepas de SE y ST produjeron biopelícula dentro de los 5 días, respectivamente. Asimismo, el 50 % del total de las cepas lo hizo en el tercer día, y el 4 % de las cepas de Gallinarum produjeron biopelícula en el segundo día.



Figura 15. Formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo

Tabla 52. Formación de biopelículas en la interfase líquido-aire de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) y *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum (SG) provenientes de granjas avícolas (ponedoras y parrilleros) e hígados de pollos parrilleros

Serotipos de <i>Salmonella</i> spp. (Nº total de cepas ensayadas)	% cepas que producen biopelículas en base a los días en la que apareció película en la interfase líquido-aire (Nº cepas)				
	No produce	2	3	4	5
SE (105)	29 (31)	42 (44)	11 (12)	10 (10)	8 (8)
ST (14)	14 (2)	14 (2)	50 (7)	14 (2)	7 (1)
SG (50)	96 (48)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total (169)	48 (81)	29 (48)	11 (19)	7 (12)	5 (9)

3.1.3. Producción de curli y celulosa por morfología de colonia en rojo congo

Los diferentes morfotipos encontrados en las cepas de *Salmonella* spp. se muestran en la **Tabla 53** y **Figura 16**. Se encontró que el 70 % de las cepas de SE resultaron RDAR, mientras que el 24 % resultó ser del morfotipo SAW. Para el serotipo

Typhimurium se encontró que la mayoría de las cepas resultaron ser del morfotipo RDAR con un porcentaje del 86 %, y el 14 % restante mostraron colonias del tipo lisas y húmedas (SAW). En cambio, para el biotipo Gallinarum se observó que el 96 % de las cepas resultó ser del morfotipo SAW y el 4 % restante del RDAR.

Tabla 53. Morfotipos de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) y *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum (SG) provenientes de granjas avícolas (ponedoras y parrilleros) e hígados de pollos parrilleros

Serotipos de <i>Salmonella</i> spp.	% cepas según el morfotipo (Nº de cepas positivas/Nº total de cepas ensayadas)			
	RDAR ¹	SAW ²	SBAM ³	BDAR ⁴
SE	70 (74/105)	24 (25/105)	4 (4/105)	2 (2/105)
ST	86 (12/14)	14 (2/14)	0 (0/14)	0 (0/14)
SG	4 (2/50)	96 (48/50)	0 (0/50)	0 (0/50)
Total	52 (88/169)	45 (75/169)	2 (4/169)	1 (2/169)

¹RDAR fenotipo rojo, seco y rugoso; ²SAW fenotipo liso y blanco; ³SBAM fenotipo liso, marrón y mucoide; ⁴BDAR fenotipo marrón, seco y rugoso.



Figura 16. Morfotipos de *Salmonella* spp. de 3 serovares diferentes

A: RDAR; B: SAW; C: BDAR

3.1.4. Prueba de producto comercial “BioFinder”

Al enfrentar las cepas de *Salmonella* spp. con el producto comercial “BioFinder” se encontró que todas las cepas generaron inmediata formación de espuma blanca, por lo que se encontró un 100 % de positividad para este ensayo (**Figura 17**).

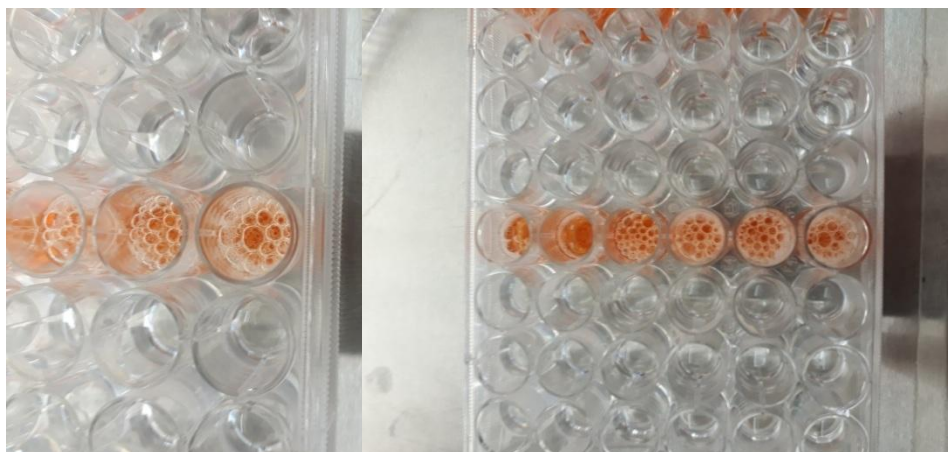


Figura 17. Producción de biopelículas con el producto comercial “BioFinder”

3.1.5 Comparación de técnicas

Al comparar los resultados obtenidos de las técnicas de tinción con cristal violeta en microplacas, formación de biopelícula en la interfase líquido-aire y los diferentes morfotipos se observó que los resultados obtenidos fueron similares. Ochenta y ocho cepas, que fueron fuertemente o moderadamente adherentes en el ensayo de tinción con cristal violeta, produjeron biopelícula en la interfase líquido-aire en 5 o menos días. Del mismo modo, el morfotipo encontrado fue RDAR. Por otro lado, el producto comercial BioFinder demostró un 100 % de positividad para la presencia de biopelículas, esto concuerda con el resultado del ensayo de tinción con cristal violeta en microplacas, ya que todas las cepas fueron adherentes en menor o mayor grado. En la **Tabla 54** se muestran los valores de concordancia entre las diferentes técnicas. Para este análisis se consideró para la técnica de cristal violeta como un único grupo a las fuertemente y moderadamente adherentes, y se clasificaron los morfotipos como RDAR por un lado y por el otro se agrupó los morfotipos SAW, SBAM y BDAR. Se encontró una excelente concordancia entre las técnicas cristal violeta, interfase líquido-aire y la morfología de la colonia. Sin embargo, la concordancia fue nula entre estas tres técnicas y el producto comercial BioFinder, siendo esta diferencia significativa (test de McNemar' con valor de $p < 0,0001$).

Tabla 54. Concordancia entre las técnicas de cristal violeta (CV), interfase líquido aire (ILA), morfología de la colonia en rojo congo (Morfotipo) y el producto comercial “BioFinder” utilizadas para la detección de biopelículas de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis, S. ser. Typhimurium y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum provenientes de granjas avícolas (ponedoras y parrilleros) e hígados de pollos parrilleros. Para la técnica de CV se consideró como un único grupo a las fuertemente y moderadamente adherentes

Serotipo	Comparación	Índice Kappa ¹	p ²
Enteritidis	CV-ILA	1	_ ³
	CV-MORFOTIPO	1	_ ³
	CV-BIOFINDER	0	<0,0001
	ILA-MORFOTIPO	1	_ ³
	ILA-BIOFINDER	0	<0,0001
	MORFOTIPO-BIOFINDER	0	<0,0001
Typhimurium	CV-ILA	1	_ ³
	CV-MORFOTIPO	1	_ ³
	CV-BIOFINDER	0	<0,0001
	ILA-MORFOTIPO	1	_ ³
	ILA-BIOFINDER	0	<0,0001
	MORFOTIPO-BIOFINDER	0	<0,0001
Gallinarum	CV-ILA	1	_ ³
	CV-MORFOTIPO	1	_ ³
	CV-BIOFINDER	0	<0,0001
	ILA-MORFOTIPO	1	_ ³
	ILA-BIOFINDER	0	<0,0001
	MORFOTIPO-BIOFINDER	0	<0,0001
Total	CV-ILA	1	_ ³
	CV-MORFOTIPO	1	_ ³
	CV-BIOFINDER	0	<0,0001
	ILA-MORFOTIPO	1	_ ³
	ILA-BIOFINDER	0	<0,0001
	MORFOTIPO-BIOFINDER	0	<0,0001

¹Indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($p < 0,05$).

²El valor de chi cuadrado se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

³No se pudo realizar la prueba de McNemar's debido a que hubo coincidencia en todos los casos (positivos a ambos y negativos a ambos).

3.2. CAPACIDAD DE LAS BAL Y SUS SOBRENADANTES PARA MODIFICAR LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SER. ENTERITIDIS Y S. SER. TYPHIMURIUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS

3.2.1 Efecto de las BAL sobre la formación de biopelículas de *Salmonella* spp.

Por un lado, se llevó a cabo el análisis de las cepas en su totalidad, dividiéndolas por serotipo. En la **Tabla 55** se presentan los valores promedio, con sus respectivas desviaciones estándar, de las absorbancias resultantes de los enfrentamientos de las cepas de SE (74) y ST (12) en el ensayo de tinción con cristal violeta. Estas cepas demostraron ser moderada y fuertemente productoras de biopelículas, tanto en condiciones de preincubación como de co-incubación, junto con los sobrenadantes de *Lentilactobacillus kefir* CIDCA 8321 y *Lactiplantibacillus plantarum* CIDCA 83114. Por lo tanto, los resultados indicaron que las cepas pertenecientes al serotipo Enteritidis exhibieron una notable disminución en la formación de biopelículas, como se refleja en una menor absorbancia, cuando fueron sometidas a ensayos de preincubación y co-incubación con *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. plantarum* CIDCA 83114. En contraste, el serotipo Typhimurium mostró variaciones en la formación de biopelículas únicamente al enfrentarse a *L. kefir* CIDCA 8321. Además, el sobrenadante de cultivo libre de células de *L. plantarum* CIDCA 83114 provocó una disminución significativa en la formación de biopelículas, indicada por una menor absorbancia, en el serotipo Enteritidis.

Por otro lado, al realizar un análisis individual por cepa, se determinó que entre el 41 y el 59 % de las cepas de SE, inicialmente fuertemente productoras de biopelículas, demostraron ser moderadamente adherentes, mientras que entre el 9 y el 17 % mostraron una adherencia débil después del tratamiento con cepas y sobrenadantes de las BAL, tanto en condiciones de co-incubación como de preincubación. Asimismo, el 43 y el 57 % de las cepas de ST, inicialmente fuertemente adherentes, se mostraron débilmente adherentes tras los tratamientos con las bacterias enteras y sobrenadantes de las BAL, ya sea en condiciones de co-incubación o preincubación, mientras que entre el 14 y el 29 % mostraron una adherencia moderada en los tratamientos con cepas de BAL, tanto en condiciones de co-incubación como de preincubación. En ambos serotipos, las cepas que inicialmente presentaban una adherencia moderada no experimentaron cambios posteriores al tratamiento con cepas y sobrenadantes de las BAL (**Tabla 56**).

Tabla 55. Valores de absorbancia en el ensayo de tinción con cristal violeta de los diferentes enfrentamientos de las cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE) y *S. ser. Typhimurium* (ST) con las cepas y sobrenadantes de *Lentilactobacillus kefir* CIDCA 8321 (LK) y *Lactiplantibacillus plantarum* CIDCA 83114 (LP) coincubadas y preincubadas. Valor promedio $\pm$ desvío estándar

Tratamiento		Combinación de enfrentamientos	Valores de absorbancia		
			SE (74)	ST (12)	Total (SE+ST)
Bacteria entera	Coincubación (incubados al mismo tiempo)	Control <i>Salmonella</i>	0,616 ± 0,360 ^a	0,455 ± 0,215 ^a	0,594 ± 0,347 ^a
		<i>Salmonella</i> + LP	0,450 ± 0,310 ^b	0,400 ± 0,231 ^a	0,443 ± 0,299 ^b
		<i>Salmonella</i> + LK	0,415 ± 0,262 ^b	0,378 ± 0,215 ^b	0,410 ± 0,255 ^b
	Preincubación (1 h de incubación previa de Bacterias ácido lácticas)	Control <i>Salmonella</i>	0,616 ± 0,360 ^a	0,455 ± 0,215 ^a	0,594 ± 0,347 ^a
		<i>Salmonella</i> + LP	0,372 ± 0,277 ^b	0,359 ± 0,238 ^a	0,370 ± 0,271 ^b
		<i>Salmonella</i> + LK	0,458 ± 0,292 ^b	0,408 ± 0,191 ^b	0,451 ± 0,280 ^b
Sobrenadante de cultivo libre de células de Bacterias ácido lácticas		Control <i>Salmonella</i>	0,616 ± 0,360 ^a	0,455 ± 0,215 ^a	0,594 ± 0,347 ^a
		<i>Salmonella</i> + LP	0,467 ± 0,271 ^b	0,416 ± 0,238 ^a	0,460 ± 0,266 ^b
		<i>Salmonella</i> + LK	0,484 ± 0,304 ^a	0,474 ± 0,299 ^a	0,483 ± 0,302 ^a

^{a, b} Los valores seguidos por letras minúsculas diferentes en la misma columna para cada condición de cultivo o sobrenadante son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 56. Resultados en los diferentes enfrentamientos de las cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE) y *S. ser. Typhimurium* (ST) con las cepas y sobrenadantes de *Lentilactobacillus kefir* CIDCA 8321 (LK) y *Lactiplantibacillus plantarum* CIDCA 83114 (LP) coincubadas y preincubadas

Serotipo de <i>Salmonella</i> spp.	Pretratamiento	Postratamiento	Bacteria entera				Sobrenadante de cultivo libre de células de bacterias ácido lácticas	
			Coincubación (incubados al mismo tiempo)		Preincubación (1 h de incubación previa con Bacterias ácido lácticas)			
			Cepa + LP	Cepa + LK	Cepa + LP	Cepa + LK	Cepa + LP	Cepa + LK
SE	Fuertemente adherente (70)	Fuertemente adherente % (n)	27 (19)	37 (26)	24 (17)	40 (28)	50 (35)	49 (34)
		Moderadamente adherente % (n)	56 (39)	54 (38)	59 (41)	50 (35)	40 (28)	41 (29)
		Débilmente adherente % (n)	17 (12)	9 (6)	17 (12)	10 (7)	10 (7)	10 (7)
	Moderadamente adherente (4)	Moderadamente adherente % (n)	100 (4)	100 (4)	100 (4)	100 (4)	100 (4)	100 (4)
		Débilmente adherente % (n)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST	Fuertemente adherente (7)	Fuertemente adherente % (n)	14 (1)	14 (1)	43 (3)	43 (3)	43 (3)	43 (3)
		Moderadamente adherente % (n)	29 (2)	29 (2)	0 (0)	14 (1)	0 (0)	0 (0)
		Débilmente adherente % (n)	57 (4)	57 (4)	57 (4)	43 (3)	57 (4)	57 (4)
	Moderadamente adherente (5)	Moderadamente adherente % (n)	100 (5)	100 (5)	100 (5)	100 (5)	100 (5)	100 (5)
		Débilmente adherente % (n)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

4. DISCUSIÓN

Las bacterias que viven como parte de una biopelícula muestran una mayor supervivencia frente al tratamiento con antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2023) y pueden ser reservorios potenciales de este patógeno tanto en las granjas como en las plantas de procesamiento de alimentos. Dado que el biofilm también puede formar un hábitat para *Salmonella* spp. en entornos agrícolas y no solo en entornos de laboratorios, su control es de suma importancia para la mejora general de la seguridad alimentaria (Schonewille *et al.*, 2012). Para evaluar la formación de biofilm de las cepas de *Salmonella* spp. existen diferentes metodologías y el uso de cada una de ellas nos permite evidenciar diferentes estructuras implicadas en este proceso. En este capítulo se estudiaron cuatro diferentes técnicas para evaluar la formación de biopelículas. Por un lado, para evidenciar y cuantificar el crecimiento en biofilm, las cepas de *Salmonella* spp. se incubaron en placa de 48 pocillos y para su cuantificación se empleó la técnica de tinción con cristal violeta y posterior medición de absorbancia. El ensayo de cristal violeta es considerado una técnica adecuada para evaluar la formación de biopelículas porque produce resultados reproducibles, lo que permite un gran número de cepas y condiciones a estudiar al mismo tiempo. Además, el método proporciona resultados cuantitativos al medir la densidad óptica de pocillos (Peeters *et al.*, 2008; Pui *et al.*, 2011; Stepanovic *et al.*, 2000; Romling y Rohde, 1999). En este trabajo de tesis y para esta técnica, solo el 4 % de las cepas de SG resultó ser fuertemente adherentes, mientras que los serotipos Enteritidis y Typhimurium mostraron valores de 67 % y 50 %, respectivamente, en las condiciones estudiadas. Agarwal *et al.* (2011) evaluaron 151 cepas de *Salmonella* spp. de 69 serotipos diferentes, las cuales 29, 87 y 34 cepas fueron clasificadas como fuerte, moderadas o débiles formadoras de biofilm respectivamente, evidenciando el carácter cepa-dependiente de esa propiedad. Por otro lado, Marín *et al.* (2009) mostraron que el 50 % de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de superficies en alojamientos para pollos de engorde y gallinas ponedoras fueron capaces de producir biopelículas. Este estudio concuerda con lo hallado por Díez-García *et al.* (2012), que indicaron que la capacidad de formar biopelículas de *Salmonella* spp. es dependiente del serotipo. En consecuencia, esto constituye un factor de virulencia que varía entre los diferentes serotipos, como sugieren otros autores (Oliveira *et al.*, 2007).

Ciertos estudios indican que *Salmonella* spp. puede formar biofilm adherida a la superficie del fondo del cultivo o formar una película en la parte superior del mismo, en la interfaz aire-líquido, dependiendo de las condiciones medioambientales, en un proceso que requiere la producción de fimbrias curli (Paytubi *et al.*, 2017; Vaccari *et al.*, 2017), celulosa (Ahmad *et al.*, 2016) y de la secreción de la proteína BapA (Latasa *et al.*, 2005). En este trabajo de tesis se estudió la formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo. Luego de 48 horas de incubación a 28°C se observó que el 42 % de las cepas de SE formaron una película en la interfaz aire-líquido mientras que el 50 % de las cepas ST lo hizo luego de 72 h. Vestby *et al.* (2009) encontraron que la capacidad de formación de estas películas y su velocidad de formación varía entre las serovariedades de *Salmonella* spp., siendo ST una lenta formadora de estas películas, ya que tarda 96 horas

o más en hacerlo y este fenotipo se correlacionó con una menor capacidad de estas cepas de persistir en el ambiente. La hidrofobicidad celular, la motilidad flagelar y/o la síntesis de polisacáridos extracelulares son factores que ayudan a las bacterias a permanecer dentro de la interfaz como una plataforma de película flotante (Donlan *et al.*, 2004; Estrada-Acosta *et al.*, 2014). Su desarrollo se ve afectado, entre otros factores, por el pH, la salinidad y la temperatura (Petrin *et al.*, 2022). En este sentido, la síntesis de celulosa puede ser un factor importante. Ahmad *et al.* (2016) encontraron que cepas de ST mutantes deficientes en celulasa producen una película visiblemente más gruesa y fuerte atribuyéndolo a mayores cantidades de celulosa. Un método válido para estudiar la producción de estructuras como fimbrias curli y celulosa consiste en sembrar las cepas de *Salmonella* spp. sobre placas de agar LB sin NaCl suplementado con rojo congo y Coomassie blue G250. El rojo congo posee gran afinidad por las fibras de celulosa y fimbrias agregativas, se adiciona al medio de cultivo para luego detectar dichas estructuras en las macrocolonias, las cuales se asocian a la producción de biofilm (Römling y Rohde, 1999). De esta forma cuando se cultivan *Salmonella* spp. en este medio, la formación de una macrocolonia de fenotipo de color rojo, seco y rugoso (RDAR), con bordes lisos o irregulares, indica la presencia de fimbrias curli y celulosa, principales componentes de la matriz del biofilm de *Salmonella* spp. En cambio, una colonia de fenotipo blanca y de aspecto suave o liso (SAW) indica la ausencia de estas estructuras. Aquellas colonias que presentan un fenotipo de color rosado (PDAR) expresan celulosa pero no fimbrias curli, mientras que, al contrario, el fenotipo de color marrón, seco y rugoso (BDAR) indica producción de curli, pero no celulosa y por último el fenotipo liso, marrón y mucoide (SBAM), expresa sobreproducción de polisacárido capsular y falta de síntesis de celulosa (Römling *et al.*, 2003). Las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas en este trabajo de tesis presentaron los fenotipos RDAR, SAW, SBAM y BDAR; con mayor cantidad de cepas de los dos primeros morfotipos, 52 % y 45 %, respectivamente. En este estudio se encontró que el 86 % de las cepas de ST resultaron ser del fenotipo RDAR, un porcentaje menor fue encontrado por Malcova *et al.* (2008), quienes identificaron que el 66 % de 96 aislamientos de ST expresó el morfotipo RDAR, pero también notó un morfotipo SBAM.

Todas las cepas de *Salmonella* spp. con fenotipo RDAR tuvieron la capacidad de formar biofilm sobre poliestireno y también fueron capaces de formar una película flotante en la interfaz aire-líquido lo cual concuerda con lo encontrado por diversos estudios (Austin, *et al.*, 1998; Römling *et al.*, 1998, 2000; Solano *et al.*, 2002). Ha sido demostrado que el fenotipo RDAR aumenta la resistencia de *Salmonella* spp. a la desecación, ya que estas logran sobrevivir durante varios meses en ausencia de nutrientes en comparación con las mutantes deficientes en fimbrias curli y / o celulosa (White *et al.*, 2006). El fenotipo rugoso RDAR, en comparación con el fenotipo liso SAW ha sido correlacionado con la habilidad de formar biofilm en poliestireno y una película en la superficie de tubos de vidrio en condiciones de baja salinidad y temperatura de 25°C a 30°C (Anriany *et al.*, 2001; de Rezende *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005). Por otro lado, las cepas con morfotipo SBAM, es decir que expresa sobreproducción de polisacárido capsular y falta de síntesis de

celulosa, y BDAR, que expresa solo curli fimbriae, resultaron ser débilmente adherentes y no formaron película en la interfaz aire-líquido, indicando que la síntesis de celulosa puede ser esencial para la producción de estas películas de *Salmonella* spp., coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Solano *et al.*, 2002; Ledebøer *et al.* 2006). Sin embargo, otros estudios indican que la celulosa parece no ser un componente importante del EPS producido por *Salmonella* spp. durante la formación de biopelículas de cálculos biliares (Prouty y Gunn, 2003) y en la matriz de biopelícula de cepas de *S. ser. Agona* y *ST*, aisladas en la industria de alimentos balanceados (Vestby *et al.*, 2009), pero se notó que incluso las cantidades más pequeñas de celulosa contribuyeron a la estructuración matricial altamente organizada. Del mismo modo, Malcova *et al.* (2009) usando un mutante *bcsA* de *SE* identificó que la celulosa no es crucial para la adherencia y la formación de biopelículas en poliestireno.

Asimismo, en este capítulo de tesis se estudió la capacidad de dos cepas de bacterias lácticas y sus sobrenadantes de cultivo, de modificar la formación de biopelículas en cepas de *SE* y *ST* provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos. Un estudio similar fue llevado a cabo por Merino *et al.* (2019), encontrando que la preincubación o coincubación, con tres cepas de *BAL* disminuyeron significativamente la capacidad de una cepa de *SE* para formar biopelículas en comparación con el control sin *BAL*. De esta forma en este trabajo de tesis, en el ensayo de coincubación, la inhibición del biofilm por parte de las *BAL* resultó significativa para la cepa de *L. kefir* (cepa que posee capa *S*) para ambos serotipos, y para la cepa *L. plantarum* (cepa que no posee capa *S*) para el serotipo Enteritidis. Se ha propuesto que las proteínas de capa *S* podrían tener un rol en la inhibición de la formación de biofilm ya que estas proteínas pueden interactuar con la superficie de *Salmonella* spp. interfiriendo en la interacción con la superficie de células intestinales en cultivo (Golowczyc *et al.*, 2007). En este trabajo la inhibición del biofilm por parte de las *BAL* resultó significativa tanto para las cepas que poseen capa *S* como para la cepa que no posee estas proteínas lo que podría indicar que pueden actuar otras estructuras o metabolitos de las *BAL* además de las proteínas de capa *S*. Además, en el ensayo de pre incubación en donde se evaluó si las *BAL* podrían ejercer una acción preventiva sobre la formación del biofilm adhiriéndose a la superficie y bloqueando los sitios de adhesión disponibles, se encontraron valores similares al obtenido en el ensayo de coincubación. Sin embargo, Woo y Ahn (2013) demostraron que la preincubación durante 24 h de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei* fue más efectiva en la inhibición de biofilms de *Salmonella* spp. que la coincubación, alcanzando valores de disminución de recuento de células viables en el biofilm de 1 orden de logaritmo. A su vez, Das *et al.* (2013) demostraron que la coincubación de *L. plantarum* y *SE* no inhibió la formación de biofilm de *Salmonella* spp., mientras que la preincubación durante 1 hora la redujo significativamente. Entre los mecanismos propuestos en la inhibición de la formación de biofilm, las cepas de *BAL* pueden producir diversos compuestos antimicrobianos que incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilo y bacteriocinas, que pueden interferir con el crecimiento del patógeno, prevenir la unión de otras especies o incluso provocar el

desprendimiento de células de las estructuras del biofilm (Westerlund *et al.*, 2006; Rendueles y Ghigo, 2012; Arena *et al.*, 2017; Camargo *et al.*, 2018). Además, los exopolisacáridos producidos por algunas cepas de BAL también pueden inhibir la formación de biopelículas por patógenos (Kim y Kim, 2009).

Estudios previos demostraron que el sobrenadante de las cepas de *L. kefir* crecidas en medio MRS tuvieron un efecto bactericida sobre SE, que no se observó con medio de cultivo acidificado artificialmente, indicando la presencia de otros metabolitos inhibidores presentes en esta fracción del cultivo (Golowczyc *et al.*, 2007). Sumado a esto, otros autores demostraron un efecto inhibitorio del sobrenadante de BAL sobre la formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae* (Al-Mathkury *et al.*, 2012), del sobrenadante de *L. fermentum* sobre el crecimiento y la formación de biofilms de *Klebsiella* (Maldonado y Silva, 2007) y que el EPS presente en el sobrenadante de las BAL tiene actividad antibacteriana y anti-biofilm sobre patógenos como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, y *Shigella flexneri* (Kim y Kim, 2009; Li y Shah, 2014; Wang *et al.*, 2015). Además, se conoce que *L. plantarum* 83114 produce grandes cantidades de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico (Golowczyc, 2008), y *L. kefir* 8321 posee proteínas de capa S que están presentes en el sobrenadante (Garrote *et al.*, 2004). Sin embargo, en este estudio solo el sobrenadante de *L. plantarum* tuvo efectos inhibitorios sobre el serotipo Enteritidis, esto también fue demostrado por Das *et al.* (2013), en donde el sobrenadante de *L. plantarum* tuvo un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Salmonella* spp. debido a la producción de ácido láctico y de otros metabolitos presentes en el cultivo.

5. CONCLUSIONES

- ✓ El porcentaje de cepas de SG, SE y ST, obtenidas de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros asociados a frigoríficos en la provincia de Entre Ríos, que forman biopelículas es del 4%, 71 % y 86 %, respectivamente.
- ✓ Existe una elevada concordancia entre las técnicas de tinción con cristal violeta en microplacas, formación de biopelícula en la interfase líquido-aire en tubo y estudio de la producción de curli y celulosa por morfología de colonia en rojo congo para la detección de biopelículas en cepas de *Salmonella* spp. provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- ✓ *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. plantarum* CIDCA 83114, en ensayos de coincubación y preincubación, disminuyen la formación de biofilm de cepas de SE provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- ✓ *L. kefir* CIDCA 8321, en ensayos de coincubación y preincubación, reduce la formación de biofilm de cepas ST provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- ✓ El sobrenadante de cultivo de *L. plantarum* CIDCA 83114 presenta sustancias bioactivas capaces de inhibir la formación de biofilm de SE provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.

CAPÍTULO 4

SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SER. ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM Y GALLINARUM PROVENIENTES DE GRANJAS AVÍCOLAS E HÍGADOS DE POLLOS PARRILLEROS DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS

1. INTRODUCCIÓN

Un antimicrobiano es una sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento. (Mandal, 2016). Dentro de los antimicrobianos se incluyen a los desinfectantes, antisépticos y a los quimioterápicos o antibióticos (Stolker y Brinkman, 2005). Los agentes antimicrobianos son usados en medicina humana y veterinaria para el tratamiento y prevención de enfermedades y han revolucionado la medicina en muchos aspectos. Sin embargo, su uso ha estado acompañado por una rápida aparición de cepas resistentes, lo que ha resultado en un problema de salud global (Thanner *et al.*, 2016).

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias y hongos) o sintetizados por métodos de laboratorio, cuya función es inhibir el crecimiento o destruir a otros microorganismos. Estos compuestos difieren en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus mecanismos de acción y espectro antimicrobiano (Patiño, 2003). Por su parte, los desinfectantes son sustancias germicidas capaces de destruir la mayoría de los microorganismos patógenos (excepto esporas), pero pueden ser tóxicos y, por tanto, solo se aplica sobre objetos inanimados, superficies y ambiente, carece de actividad selectiva, ya que elimina todo tipo de gérmenes. Su espectro de actuación, tiempo de inicio de activación, tiempo de actividad, efecto residual, toxicidad, capacidad de penetración y posibles materiales o circunstancias que los inactiven pueden variar de un producto a otro (Gómez y Doñate, 2019). Los mecanismos por medio de los cuales los desinfectantes matan o inhiben la multiplicación de los microorganismos son variados y complejos. En general, todos los efectos observables de los agentes químicos sobre las bacterias son el resultado de alteraciones en sus componentes macromoleculares, algunos de estos cambios lesionan la membrana celular, otros inactivan de forma irreversible las proteínas y varios inducen un daño profundo en ácidos nucleicos (Jimenez y Swarbrick 2004). Algunos desinfectantes se componen de formulaciones complejas que comprenden sustancias químicas, jabones, detergentes y compuestos que favorecen la penetración de las sustancias activas (Kahrs, 1995).

En los últimos años, los aceites esenciales han surgido como agentes antimicrobianos de notable relevancia. Estos compuestos naturales se destacan por sus propiedades bactericidas y fungicidas, lo cual les confiere una significativa importancia tanto en el ámbito médico como en la industria alimentaria. Su uso se ha popularizado como medida preventiva contra intoxicaciones ocasionadas por diversas bacterias ambientales (El Asbahani *et al.*, 2015). Estos son mezclas complejas de líquidos que presentan alta volatilidad, evaporándose al contacto con el aire (Bello, 1999). Son obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Burt, 2007). Químicamente están formados por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos), sustancias azufradas y nitrogenadas (Acevedo *et al.*, 2007). Se consideran producto del metabolismo

secundario de las plantas al igual que algunos alcaloides, flavonoides, taninos, y saponinas (Bandoni *et al.*, 2009; Madsen y Bertelsen, 1995).

Cuando *Salmonella* spp. se encuentra presente en las granjas, el uso de antimicrobianos ayuda a disminuir las pérdidas causadas por la mortalidad en las aves afectadas. Sin embargo, el uso periódico de antibióticos induce no solamente a resistencia por parte de este microorganismo, sino también lleva a que las aves se transformen en portadoras crónicas que eliminan *Salmonella* spp. en el medio ambiente y son quizá el principal foco de diseminación dentro de un lote (Botero Hoyos, 2007) y de esta forma puede llevar a la transmisión y ocurrencia de salmonelosis en humanos (Weiler *et al.*, 2017). A su vez, los antibióticos pueden ser utilizados como agentes profilácticos en el agua de las aves sanas y como promotores del crecimiento en concentraciones subterapéuticas en la alimentación (Phillips *et al.*, 2004; Apata, 2009). Las clases de antibióticos usados como terapéuticos en avicultura incluyen: aminoglucósidos, tetraciclinas, β -lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, polipéptidos, sulfonamidas y trimetoprima (Stolker y Brinkman, 2005). En animales de granja tratados con antibióticos, los residuos de estos compuestos son eliminados en el medio ambiente, lo cual genera una presión selectiva sobre la población bacteriana generando resistencia. Entre las causas, la dinámica y la epidemiología de la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos, tanto en animales como en humanos, se apunta especialmente a la utilización excesiva e indebida de los mismos en animales (Ardoino *et al.*, 2017).

La eliminación de *Salmonella* spp. de las granjas avícolas es una tarea difícil (Davies y Breslin, 2003; Gradel *et al.*, 2005). Los principales riesgos de infección por esta bacteria en aves de corral incluyen el estado sanitario de las crías de parvadas anteriores (Rose *et al.*, 2000), la ineficacia en la limpieza y desinfección entre lotes de aves (Rose *et al.*, 2003; Davies y Breslin, 2003; Gradel *et al.*, 2005), la presencia de *Salmonella* spp. en pollitos de un día (Cardinale *et al.*, 2004), la contaminación por desechos (Rojas *et al.*, 2002), la contaminación del alimento y el agua (Heyndrickx *et al.*, 2002), la presencia de portadores contaminados (Davies y Breslin, 2003), la presencia de roedores, moscas y escarabajos, y la inadecuada desinfección de los camiones de transporte al matadero (Ramesh *et al.*, 2002). A su vez, la formación de biopelículas por microorganismos representa un serio problema para los sectores industrial, de salud y de la producción de alimentos, debido a la dificultad para eliminarlas una vez formadas. Para que el desinfectante tenga efecto sobre las células debe reaccionar primero con los polisacáridos de la biopelícula; con el riesgo de oxidarse al entrar en contacto con estos compuestos y perder su efectividad (Sapers, 2003). Por otra parte, después de un tratamiento con biocida, las células bacterianas pueden incrementar la producción de exopolímeros, como respuesta de defensa, dejando sin efectividad al producto (Kumar y Anand, 1998). Las biopelículas de *Salmonella* spp. en superficies de plástico, cemento y acero inoxidable son mucho más resistentes a los desinfectantes cloro y yodo en comparación con las células planctónicas (Joseph *et al.*, 2001).

Por lo dicho anteriormente, el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de *Salmonella* spp. es crucial para el éxito de la producción avícola y, a su vez, para evitar la propagación de la resistencia a los antibióticos. Debido a ello, los objetivos de este capítulo fueron:

- Evaluar la sensibilidad *in vitro* a antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria para el control de enfermedades producidas en aves por cepas de SE, ST y SG aisladas de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los antibióticos que presentaron una resistencia superior al 80 % de las cepas estudiadas.
- Evaluar la sensibilidad *in vitro* a antibióticos comerciales, aceites esenciales y otros productos frente a cepas de SE, ST y SG, aisladas de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos
- Evaluar la sensibilidad a desinfectantes generalmente utilizados en granjas avícolas de cepas de SE, ST y SG, aisladas de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- Evaluar la eficacia de los desinfectantes, generalmente utilizados sobre diferentes superficies en granjas avícolas, frente a cepas de SE y ST, productoras y no productoras de biopelículas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS UTILIZADAS

Debido a su implicancia en la producción avícola y salud pública se seleccionaron las cepas de *Salmonella* spp. de los serotipos Gallinarum, Enteritidis y Typhimurium (Terzolo, 2004, Gast y Porter, 2020) aisladas en el capítulo 2 de este trabajo de tesis. De esta forma se seleccionaron 169 cepas, de las cuales 105 cepas correspondieron a SE, 14 de ST y 50 a SG.

2.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA

Se utilizó el método de difusión en placa según las recomendaciones del Instituto de estandarización clínica y de laboratorio de Estados Unidos (CLSI, 2022 a,b). Se evaluaron 30 antibióticos, de los cuales 11 son de uso en medicina veterinaria, 11 de uso en medicina humana y 8 de uso tanto en medicina humana como veterinaria (**Tabla 57**). Los discos de antibióticos ensayados fueron de la marca OXOID (Inglaterra) a excepción de la fosfomicina / tilosina (FOSBAC PLUS T-BEDSON TM, Britania). Para controlar la precisión y la exactitud de las pruebas de difusión se usó como cepa control del ensayo *Escherichia coli* ATCC 25922.

A partir de 2 a 5 colonias bacterianas aisladas, se preparó una suspensión en caldo tripteína de soja (CTS), se incubó a 37 °C de 2 a 4 h hasta alcanzar la turbidez del estándar equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas de agar Mueller-Hinton (MH; Difco, Estados Unidos) fueron sembradas con hisopo estéril en todas las direcciones de manera de obtener un crecimiento bacteriano en césped. Se dejaron secar aproximadamente de 3 a 5 min y luego se colocaron los discos a ensayar con pinza estéril ejerciendo una leve presión en el agar MH. A su término, fueron incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Para la lectura de los halos se tuvo en cuenta el área que no mostró desarrollo obvio a simple vista; esto no incluyó velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona de inhibición (Galas y Pasterán, 2008). El diámetro del halo de inhibición de crecimiento fue medido con una regla (escala 1 mm) y la sensibilidad fue determinada según las recomendaciones de ANLIS Dr.C.G.Malbrán & WHONET- Argentina (2021), y CLSI (2022a, b) para tigeciclina y el resto de antibióticos (excepto neomicina, eritromicina, colistina y fosfomicina/tilosina), respectivamente. Para la eritromicina y la neomicina, se tomaron los puntos de corte para *Staphylococcus aureus* del CLSI (2022a) y Zurita et al. (1989), respectivamente, ya que ni el Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST del inglés) ni CSLI han definido criterios de enterobacterias para el ensayo de resistencia a antibióticos por difusión en disco. Para el caso de la colistina, se utilizó el punto de corte sugerido para *Pseudomonas* spp. según CLSI (2007), basado en la comparación realizada por Hoffmann *et al.* (2022) con cepas de SE. Por su

parte, el diámetro del halo de inhibición de crecimiento utilizado para fosfomicina /tilosina fue el mismo que la fosfomicina. En base a ello los microorganismos fueron clasificados como cepas sensibles, cepas con sensibilidad intermedia o cepas resistentes.

Tabla 57. Antibióticos evaluados frente a diferentes cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.

Grupo de Antimicrobiano	Subgrupo de Antimicrobiano	Antibiótico	Concentración del disco (µg/disco)
Penicilinas	Aminopenicilinas	Ampicilina ¹	10
		Amoxicilina ¹	10
	Aminopenicilinas /Inhibidores de β-lactamasas	Amoxicilina/Ácido clavulánico ¹	30
Cefalosporinas	1º generación	Cefalotina ²	30
	2º generación	Cefoxitima ³	30
	3º generación	Cefixima ³	5
		Cefotaxima ³	30
		Ceftazidima ³	30
		Cefpodoxima ³	10
Carbapenemes		Imipenem ³	10
Quinolonas	1º generación	Ácido nalidíxico ³	30
	2º generación	Ciprofloxacina ¹	5
		Norfloxacina ²	10
	3º generación	Enrofloxacina ²	5
Tetraciclinas	1º generación	Tetraciclina ²	30
	2º generación	Doxiciclina ²	30
	3º generación (Glicilciclinas)	Tigeciclina ³	15
Fenicoles		Cloranfenicol ¹	30
		Florfenicol ²	30
Aminoglucósidos		Amicacina ³	30
		Estreptomina ¹	10
		Gentamicina ¹	10
		Kanamicina ²	30
		Neomicina ²	30
Inhibidores de la vía del folato		Sulfametoxazol/Trimetoprima ³	25
Polimixinas		Colistina ¹	10
Derivados del ácido fosfónico		Fosfomicina ²	50
Macrólidos		Eritromicina ²	15
		Azitromicina ³	15
Fosfonatos/Macrólidos		Fosfomicina/Tilosina ²	160/40

¹ Antimicrobianos usados en medicina humana y veterinaria.

² Antimicrobianos usados en medicina veterinaria.

³ Antimicrobianos usados en medicina humana.

2.2.1. Determinación de co-resistencia

La co-resistencia a los antibióticos ensayados, pertenecientes a diferentes categorías, se calculó a través del índice de resistencia múltiple a los antibióticos (IRMAs), según la fórmula (Singh *et al.*, 2010):

$$\text{IRMAs} = \frac{\text{Nº de antibióticos resistentes}}{\text{Nº total de antibióticos ensayados}}$$

Los aislamientos clasificados como de sensibilidad intermedia, según la zona de inhibición del crecimiento microbiano, fueron considerados como sensibles para el cálculo del coeficiente de IRMAs.

Por otro lado, se consideró el término de multirresistencia (ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de tres o más categorías; MDR), resistencia extensa (ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de todas las categorías excepto una o dos; XDR), panresistencia (ausencia de sensibilidad a todos los antibióticos de todas las categorías; PDR) en base a lo propuesto por Magiorakos *et al.* (2012). A su vez, se tuvo en cuenta, que si una cepa bacteriana tiene resistencia intrínseca a un agente antimicrobiano o a toda la categoría, ese agente o categoría debe eliminarse de la lista antes de aplicar los criterios para las clasificaciones (Magiorakos *et al.*, 2012).

2.3.DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM)

Los antibióticos que mostraron resistencia a por lo menos el 80 % de las cepas estudiadas fueron considerados para realizar estudios de CIM. Para ello se empleó el método de microdilución en caldo, según recomendaciones del CLSI (CLSI, 2015 y 2017). Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo y la prueba se realizó en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo y cada pocillo contenía 0,1 ml de caldo Mueller-Hinton (Difco). Para obtener las diluciones de los antibióticos, se prepararon en un volumen final de 10 ml y se colocaron 0,1 ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico. En cada policubeta se incluyó un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico), y un control negativo (caldo sin inocular). El inóculo estándar se obtuvo por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland suspensión en CTS. Una vez obtenido el inóculo de turbidez indicada anteriormente, se diluyó en solución fisiológica para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada pocillo contenga aproximadamente 5×10^5 UFC/ml. De esta forma, con un volumen final en cada pocillo de 0,1 ml y el volumen de inóculo a agregar de 0,005 ml, la concentración de la suspensión ajustada fue de 1×10^7 UFC/ml. Por ello, se diluyó la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml) en relación 1/10. Cuando se colocaron 0,005 ml de esta suspensión a cada pocillo con la solución de antibiótico se obtuvo una concentración de

bacterias de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml. Todas las policubetas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h.

La CIM se definió como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el pocillo. El punto final quedó definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Para determinar el punto final de desarrollo, se comparó cada pocillo con el pocillo control de crecimiento. El ensayo se consideró válido si en el pocillo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento > 2 mm de diámetro o turbidez neta.

2.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS COMERCIALES UTILIZADOS EN GRANJAS AVÍCOLAS

Los productos comerciales que contenían antibióticos utilizados en granja fueron escogidos de acuerdo a los datos obtenidos por las encuestas realizadas en las granjas (Capítulo 2) y fueron proporcionados por las empresas relacionadas con la avicultura (**Tabla 58**). Los 22 productos fueron enfrentados en la dosis recomendada por el fabricante, a la mitad y al doble de dicha dosis. En el caso de los productos que fueran listos para su uso, solo se los probó en la dosis recomendada y la mitad. Todas las diluciones fueron realizadas con agua destilada estéril.

A partir de 2 a 5 colonias bacterianas aisladas se preparó una suspensión en CTS, se incubó a 37°C de 2 a 4 h hasta alcanzar la turbidez del estándar equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland. Las placas de agar MH (Difco) fueron sembradas con hisopo estéril en todas las direcciones de manera de obtener un crecimiento bacteriano en césped. Se dejaron secar aproximadamente de 3 a 5 min. Posteriormente, se colocó 15 μl del producto sobre la inoculación y se evaluó el diámetro de inhibición producido luego de la incubación durante 18-24 h a 37°C . De esta forma las cepas que presentaron halos ≥ 10 mm fueron consideradas sensibles, entre >0 mm y <10 mm intermedias, y 0 mm (caso que no había ningún halo de inhibición) resistentes.

Tabla 58. Antibióticos comerciales utilizados en las pruebas contra *Salmonella* spp. de acuerdo a su dosis de uso recomendada.

Grupo de Antimicrobiano	Subgrupo de Antimicrobiano	Nombre comercial (Empresa)	Principio activo (Concentración %)	Dosis de uso (mg/Kg peso vivo)	Concentración en agua y/o alimento
Penicilinas	Aminopenicilinas	Amoxixilina (LAB. SCOPE)	Amoxicilina (100)	20	400 g/tn de alimento
		Ave Ruminal (Ruminal)	Amoxicilina base (50)	20 - 30	200 g/1000 l de agua
Quinolonas	2º generación	Vetantril-N Polvo soluble (Vetanco)	Nicotinato de norfloxacin (100)	20	200 g/1000 l de agua
	3º generación	ENRO 10 (AGROPECUARIA MH)	Enrofloxacin (10)	2,5 - 5	50-100 ml/200 l de agua
		Floxagen Oral (VETANCO)	Enrofloxacin (10)	10	50 ml/100 l de agua
Tetraciclinas	1º generación	Oxi-Scope 50 (LAB. SCOPE)	Oxitetraciclina base (50)	20- 40	800 g/tn de alimento 400 g/1000 l de agua
		Terramicina (Zoetis)	Clorhidrato de oxitetraciclina (5)		Inyectable
Fenicoles		Microflud F Solución (VETANCO)	Florfenicol (10)	10	1000 ml/1000 l de agua
		Florfenicol Aves 10 (FACYT)	Florfenicol (10)	30	1-1,5 ml/1 l de agua
Inhibidores de la vía del folato		SUCLORTRIM® 75 (CARVAL)	Sulfacloropiridazina sódica (62,5) trimetoprim (12,5)	24	200 g/tn de alimento 100 g/500 l de agua
		Trimet (NIESER)	Sulfametoxazol (10) Trimetoprima (2)	25 5	1000 ml/1000 l de agua
Polimixinas		Sin marca	Colistina	20	200 g/1000 l de agua
Macrólidos		CERTYL® SOLUBLE (CARVAL)	Fosfato de tilmicosina (25)	15-20	0,3 ml/1 l de agua
		W-TILMICOSIN 25 % (WEENDE SRL)	Tilmicosina (25)	7,5	300 ml/1000 l de agua
		Valosin 425 (VETANCO)	Tartrato de tilvalosina (4,25)	12,75	1-3 kg/tn de alimento
		Tilotar 100 (LAB. SCOPE)	Tartrato de tilosina (100)	110	1,4 kg/ tn de alimento
		Tilosina tartrato (LAB. ROMIKIN SA)	Tartrato de tilosina (100)	110	1,4 kg/ tn de alimento

Continuación de la Tabla 58.

Grupo de Antimicrobiano	Subgrupo de Antimicrobiano	Nombre comercial (Empresa)	Principio activo (Concentración %)	Dosis de uso (mg/Kg peso vivo)	Concentración en agua y/o alimento
Fosfonatos/ Macrólidos		Fosbac Plus T (BENSON)	Fosfomicina (20) tilosina (5)	160	800 g/1000 l de agua
Penicilinas/ Polimixinas		Agrocolixina (AGROPECUARIA MH)	Amoxicilina trihidrato (50) colistina sulfato (10)	20	400 ml/1000 l de agua
		Amoxicilina Colistina (CARVAL)	Amoxicilina colistina	25	250 g/1000 l de agua
Tetraciclinas/ Polimixinas		Doxicolistina (WEENDE S.R.L.)	Doxiciciclina colistina	10	600 g/700-800 l de agua
Polimixinas/ Aminoglucósidos		Probird Soluble (EZEGAB)	Colistina sulfato (6) gentamicina sulfato (6)	5	0,75-1g/1 litro de agua

2.5. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A OTROS ANTIMICROBIANOS

Se ensayó la sensibilidad a otros antimicrobianos, y se procedió del mismo modo que el punto 2.4 pruebas de sensibilidad a antimicrobianos comerciales utilizados en granjas. Se utilizaron una enzima (lisozima) y los aceites esenciales de romero, orégano y espartillo. La lisozima fue proporcionada por el laboratorio Scope S.A. de Entre Ríos. La concentración de lisozima ensayada fue la misma en la que se encuentra en la clara de los huevos de gallina, es decir 3,5 % (Abdou *et al.*, 2013), y, a su vez, se enfrentó una concentración al doble y una a la mitad. Por lo tanto, las concentraciones ensayadas fueron, 1,75, 3,50 y 7,00 %; mientras que los tres aceites esenciales fueron proporcionados por el Banco de Germoplasma Sabor y Salud® y para su obtención se utilizó un método denominado “arrastre por vapor de agua,” que consistió en someter al material a la acción del vapor que rompió los tricomas que contenían el aceite y los compuestos volátiles fueron arrastrados a una trampa donde al condensar se separaron dos fases; aceites esenciales y agua. A diferencia del resto de los antimicrobianos, los aceites fueron enfrentados a las cepas de *Salmonella* spp. sin dilución previa.

2.6. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DESINFECTANTES

Para probar la sensibilidad a diferentes desinfectantes comerciales utilizados en granjas y frigoríficos de aves, se utilizó el método denominado microdilución en caldo llevado a cabo en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo según recomendaciones del CLSI (CLSI, 2015 y 2017). Este método se denomina así porque involucra pequeños volúmenes de caldo y la prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo y cada pocillo contenía 0,1 ml de caldo Mueller-Hinton (Acumedia-Neogen) (CLSI, 2015 y 2017). De los 17 productos desinfectantes utilizados, 15 fueron escogidos de acuerdo a los datos obtenidos por las encuestas realizadas en las granjas (Capítulo 2). Estos productos fueron proporcionados por las empresas relacionadas con la avicultura. Además, se utilizaron dos productos usados como desinfectantes en viviendas. Se realizaron 7 diluciones de cada producto desinfectante, teniendo en cuenta la concentración recomendada por el fabricante, se realizaron diluciones por encima y por debajo de dicho valor. Los productos se pueden ver en la **Tabla 59**. Para obtener las diluciones de los desinfectantes se prepararon en un volumen final de 10 ml y se colocaron 0,1 ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico. En cada policubeta se incluyó un pocillo de control de crecimiento (cepa sin desinfectante), y un control negativo (caldo sin inocular).

En todos los casos se partió de un inóculo estándar, se obtuvo por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland en CTS (Acumedia-Neogen). Luego de ello, se diluyó en solución fisiológica para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada pocillo contenga aproximadamente 5×10^5 UFC/ml. De esta forma, con un volumen final en cada pocillo de 0,1 ml y el volumen de inóculo a agregar de 0,005 ml, la concentración de la suspensión ajustada fue de 1×10^7

UFC/ml. Por lo tanto, se diluyó en relación 1/10 la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml). Se colocaron 5 μ l de esta suspensión a cada pocillo con la solución de antibiótico para obtener una concentración de bacterias de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml. Todas las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 h.

La concentración mínima inhibitoria (CIM) se definió como la menor concentración del desinfectante capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el pocillo. El punto final quedó definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Para determinar el punto final de desarrollo, se comparó cada pocillo con el pocillo control de crecimiento. El ensayo se consideró válido si en el pocillo control de crecimiento se observó un botón de crecimiento > 2 mm de diámetro o turbidez neta.

Tabla 59. Productos desinfectantes con las dosis recomendadas por el fabricante y el rango de dosis para ser enfrentados con las cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis, *S. ser. Typhimurium* y *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum

Desinfectante comercial (Laboratorio)	Principio activo	Rango de dosis ensayado (% v/v)	Dosis recomendada por fabricante (% v/v)
Iodopovidona (Faeve)	Povidona iodo	0,0625 - 4	0,1 – 0,5
Solución de cresol al 50 % (Faeve)	Cresol	0,0625 - 4	1 - 4
Solución de cresol al 50 % Nueva formulación (Faeve)	Cresol	0,0625 - 4	1 - 4
Nieser CRESL 400 (Nieser)	Ácido cresílico - emulsionantes	0,03125 - 2	0,25
Formol 37 % (Nieser)	Formol	0,125 - 8	0,5 - 5
Agua lavandina (Ayudín®)	Hipoclorito de sodio (35 g Cl/I)	0,15625 - 10	5 ¹
Benzalcon Forte (Faeve)	Amonio cuaternario	0,005 - 0,32	0,04 – 0,067
FF46 Amonio (Anjober SRL)	Amonio cuaternario	0,05 - 3,2	0,1 - 2
Amonio 50 (Nieser)	Amonio cuaternario	0,0025 - 0,16	0,02
X905 (Farmabase)	Amonio cuaternario	0,05 - 3,2	0,4
Pursue (Amway)	Amonio cuaternario	0,0625 - 4	0,5
Ruminal 50 (Ruminal)	Amonio cuaternario	0,005 - 0,32	0,04
TH4 (Biotay-Phibro)	Amonios cuaternario y glutaraldehído	0,0625 - 4	0,5
Vinagri Plus (Diversey)	Amonios cuaternario y glutaraldehído	0,025 - 1,6	0,2 - 1
Glutavet (Vetser S.A.)	Amonios cuaternario y glutaraldehído	0,05 - 3,2	0,4
Nieser Squad (Nieser)	Amonios cuaternario y aldehído	0,78125 - 50	Listo para usar (puro)
X5 (Bimex)	Amonio cuaternario glutaraldehído, glyoxal, formaldehído e isopropanol	0,03125 - 2	0,25

¹ según CDC y Lavandina Ayudín®

2.7. DESINFECTANTES SOBRE SUPERFICIES, EN CEPAS PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS

Para determinar si la producción de biopelículas sobre las superficies le otorga a las cepas de *Salmonella* spp. mayor resistencia a los desinfectantes, se escogieron cuatro cepas de *Salmonella* spp. con diferente capacidad de producir biopelículas (**Tabla 60**). Se escogieron dos superficies diferentes: cama, que se utiliza en los galpones de pollo parrillero, y aluminio. De la cama se colocaron 0,5 g en un tubo de ensayo, y de aluminio se colocaron discos de 10 mm de diámetro en un tubo. Ambos materiales fueron esterilizados previo a los ensayos en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

En primera instancia, se inocularon las cepas sobre las diferentes superficies a ensayar, de esta forma se dio la posibilidad de que las cepas desarrollen biopelícula. Para el caso de los discos de aluminio y la cama, se colocaron 20 µl y 100 µl del inóculo, respectivamente, con una concentración de 1×10^8 UFC/ml. En ambos casos, se incubó durante 48 h a 28 °C. Se realizó el recuento del inóculo inicial, el mismo se calculó por el método propuesto por Miles *et al.* (1938) y se expresó como UFC/disco y UFC/g para discos de aluminio y cama, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionó 1 ml de la dosis del desinfectante en el caso de los discos de aluminio y 5 ml para el caso de cama. Se ensayaron 3 diluciones por desinfectante y un control sin desinfectante (**Tabla 61**). Estos ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones utilizadas se basaron en las proporcionadas por las etiquetas de los recipientes de cada desinfectante. Por ello, se emplearon la dosis recomendada y una concentración al doble y otra a la mitad. Se dejó en contacto el desinfectante con las superficies durante 24 h. Una vez transcurrido dicho tiempo se realizaron diluciones seriadas y luego la inoculación para efectuar recuento, de la misma forma que se realizó el recuento del inóculo inicial. El límite de detección de la técnica fue de 40 UFC/ml.

Tabla 60. Cepas de *Salmonella* spp. utilizadas en los ensayos de resistencia a los desinfectantes sobre cama y aluminio

Cepas de <i>Salmonella</i> spp.	Origen y/o colección de cultivo	Producción de Biopelículas
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis 160/16	Hígado ave muerta en granja, INTA EEA C. del Uruguay	Débilmente adherente
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis 495/15	Cáscara de huevo en granja, INTA EEA C. del Uruguay	Fuertemente adherente
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium 654/15	Hígado obtenido en mercado minorista, INTA EEA C. del Uruguay	Débilmente adherente
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium 347/16	Guano de ave, INTA EEA C. del Uruguay	Fuertemente adherente

Tabla 61. Productos desinfectantes con su respectiva dosis utilizados en cama y aluminio en los ensayos con contaminación con *Salmonella* ser. Enteritidis, y *S. ser. Typhimurium*

Desinfectante comercial	Dosis ensayadas (% v/v)
Iodopovidona	0,25; 0,50; 1
Solución de cresol al 50 %	1 ; 2; 4
Solución de cresol al 50 % (Nueva formulación)	1;- 2; 4
Nieser CRESL 400	0,125; 0,25; 0,5
Formol 37 %	0,5; 1; 2
Agua lavandina	2,5; 5; 10
Benzalcon Forte	0,02; 0,04; 0,08
FF46 Amonio	0,2; 0,4; 0,8
Amonio 50	0,01; 0,02; 0,04
X905	0,2; 0,4; 0,8
Pursue	0,25; 0,5; 1
Ruminal 50	0,02; 0,04; 0,08
TH4	0,25; 0,50; 1
Vinagri Plus	0,2; 0,4; 0,8
Glutavet	0,2; 0,4; 0,8
Nieser Squad	25; 50; puro
X5	0,125; 0,25; 0,5

2.7.1. Análisis estadístico

Los recuentos de las bacterias se pasaron a logaritmo y se expresaron como la media y el desvío estándar. Las diferencias significativas asociadas a los diferentes tratamientos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional. La diferencia estadística se indicó con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA

La totalidad de las cepas resultaron resistentes a la eritromicina y fueron sensibles a 20 de los 30 antibióticos ensayados: fosfomicina, colistina, gentamicina, neomicina, ampicilina, kanamicina, cefalotina, amoxicilina, cloranfenicol, azitromicina, cefpodoxima, amoxicilina/ácido clavulánico, amicacina, cefixima, cefotaxima, cefoxitima, ceftazidima, imipenem, tigeciclina, fosfomicina/tilosina. En los 9 antibióticos restantes ensayados, la mayoría de las cepas fueron sensibles (**Tabla 62**). Para esos antibióticos, SG, SE y ST presentaron sensibilidad mayor al 54, 77, y 42 %, respectivamente. Asimismo, un alto porcentaje de cepas resultaron sensibles a los antibióticos sulfametoxazol/trimetoprima y los de la familia de las tetraciclinas (doxiciclina y tetraciclina) con un 99 y 94 %, respectivamente, y sensibilidad de entre el 74 y 81 % para los antibióticos florfenicol, enrofloxacin, norfloxacin y estreptomycin. Además, ciprofloxacina y ácido nalidíxico mostraron menor sensibilidad que los anteriores con un 55 y 66 % respectivamente. Los valores de resistencia intermedia estuvieron entre el 15 y el 24 % para los antibióticos florfenicol, enrofloxacin y estreptomycin; y fue del 42 % para ciprofloxacina. Por otro lado, los valores de resistencia estuvieron entre un 1 y 6 % para los antibióticos tetraciclina, enrofloxacin, doxiciclina, sulfametoxazol/trimetoprima, ciprofloxacina y estreptomycin; y de 21 y 34 % para norfloxacin y ácido nalidíxico, respectivamente.

Sin tomar en cuenta la resistencia a la eritromicina y la sensibilidad a los 20 antibióticos antes nombrados, se encontró que todas las cepas de SE ensayadas fueron sensibles a 6 antibióticos: tetraciclina, florfenicol, doxiciclina, sulfametoxazol/trimetoprima, norfloxacin y estreptomycin. A su vez, un 95 % de estas cepas fueron sensibles para enrofloxacin y ácido nalidíxico y un 78 % para ciprofloxacina, mostrando el 22 % restante una resistencia intermedia para este antibiótico. Además, se encontró 1 y 5 % de resistencia para enrofloxacin y ácido nalidíxico, respectivamente. En el caso de ST se encontró que la totalidad de las cepas resultaron sensibles a 3 antibióticos (además de los 20 antes nombrados): florfenicol, sulfametoxazol/trimetoprima y norfloxacin. A su vez, se encontró un 79 % de cepas sensibles a enrofloxacin, ciprofloxacina y ácido nalidíxico, un 57 % para estreptomycin y un 43 % para tetraciclina y doxiciclina. Por otro lado, enrofloxacin y ciprofloxacina mostraron valores de sensibilidad intermedia del 21 %. A su vez, se encontró elevada resistencia para tetraciclina (57 %), y doxiciclina (43 %). Para SG se encontró que el 96 % de las cepas resultaron sensibles para 3 antibióticos tetraciclina, doxiciclina y sulfametoxazol/trimetoprima, un 48 % para estreptomycin y 24 % para florfenicol y 28 % para enrofloxacin y norfloxacin. Por otro lado, los valores de sensibilidad intermedia estuvieron entre 52 y 90 % para estreptomycin, enrofloxacin, florfenicol y ciprofloxacina. Además, se encontró un 4 % de resistencia para tetraciclina, enrofloxacin, doxiciclina y sulfametoxazol/trimetoprima y 10 % y 72 % para ciprofloxacina y norfloxacin, respectivamente. Mientras que todas las cepas de SG fueron resistentes para ácido nalidíxico.

Tabla 62. Sensibilidad a antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), S. ser. Typhimurium (ST) y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros

Serotipo (Nº cepas)	Resultado	% DE CEPAS SEGÚN EL ANTIBIÓTICO (Nº DE CEPAS)								
		TE	FFC	ENR	DO	SXT	NOR	CIP	NA	S
SE (105)	Sensible	100 (105)	100 (105)	95 (100)	100 (105)	100 (105)	100 (105)	78 (82)	95 (100)	100 (105)
	Intermedio	0 (0)	0 (0)	4 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (23)	0 (0)	0 (0)
	Resistente	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (5)	0 (0)
ST (14)	Sensible	43 (6)	100 (14)	79 (11)	43 (6)	100 (14)	100 (14)	79 (11)	79 (11)	57 (8)
	Intermedio	0 (0)	0 (0)	21 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	21 (3)	0 (0)	0 (0)
	Resistente	57 (8)	0 (0)	0 (0)	57 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	21 (3)	43 (6)
SG (50)	Sensible	96 (48)	24 (12)	28 (14)	96 (48)	96 (48)	28 (14)	0 (0)	0 (0)	48 (24)
	Intermedio	0 (0)	76 (38)	68 (34)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	90 (45)	0 (0)	52 (26)
	Resistente	4 (2)	0 (0)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	72 (36)	10 (5)	100 (50)	0 (0)
TOTAL (169)	Sensible	94 (159)	78 (131)	74 (125)	94 (159)	99 (167)	79 (133)	55 (93)	66 (111)	81 (137)
	Intermedio	0 (0)	22 (0)	24 (41)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	42 (71)	0 (0)	15 (26)
	Resistente	6 (10)	0 (0)	2 (3)	6 (10)	1 (2)	21 (36)	3 (5)	34 (58)	4 (6)

TE: tetraciclina; FFC: florfenicol; ENR: enrofloxaxina; DO: doxiciclina; SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprima; NOR: norfloxaxina; CIP: ciprofloxacina; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomicina.

3.1.1. Determinación de co-resistencia

El coeficiente IRMAs de las cepas de SE (**Tabla 63**) estuvo entre 0,03 y 0,10, asimismo el 95 % mostró el patrón de resistencia eritromicina, mientras que el 4 y 1 % de las cepas restantes mostraron el perfil de resistencia eritromicina - ácido nalidíxico y eritromicina - ácido nalidíxico - enrofloxacin, respectivamente. Por otro lado, las cepas de ST mostraron perfiles de resistencia variable con un mayor porcentaje (43 %) del perfil eritromicina -doxixiclina- tetraciclina - estreptomina, seguido por el 21 % para los perfiles eritromicina y eritromicina - ácido nalidíxico y el 14 % restante se encontró el perfil de resistencia eritromicina -doxixiclina- tetraciclina, mostrando así variaciones del IRMAs que van desde 0,03 a 0,13. Por último, las cepas de SG mostraron valores de IRMAs entre 0,07 y 0,17, con el 62 % de las cepas con el perfil de resistencia eritromicina - ácido nalidíxico - norfloxacin, seguido por el 24 % del perfil de eritromicina - ácido nalidíxico, 6 % de las cepas mostraron el perfil de resistencia de eritromicina - ácido nalidíxico - norfloxacin - ciprofloxacina, y por último el 8 % de las cepas mostraron resistencia a 5 antibióticos de las cuales la mitad tuvo el perfil de resistencia eritromicina - ácido nalidíxico - doxixiclina - tetraciclina - sulfametoxazol/trimetoprima y la otra mitad eritromicina - ácido nalidíxico - enrofloxacin - norfloxacin - ciprofloxacina.

Tabla 63. Perfiles de resistencia a antimicrobianos e índice de resistencia múltiple a antibióticos (IRMAs) en aislamientos de *Salmonella* ser. Enteritidis, S. ser. Typhimurium y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros

Nº de antibióticos resistentes	Serovariedad	Nº de aislamientos	Patrón de multiresistencia	IRMAs
1	Enteritidis	100	E	0,03
	Typhimurium	3		
2	Enteritidis	4	E-AN	0,07
	Typhimurium	3		
	Gallinarum	12		
3	Enteritidis	1	E-AN-ENR	0,10
	Typhimurium	2	E-DO-TE	
	Gallinarum	31	E-AN-NOR	
4	Typhimurium	6	E-DO-TE-S	0,13
	Gallinarum	3	E-AN-NOR-CIP	
5	Gallinarum	2	E-AN-DO-TE-STX	0,17
	Gallinarum	2	E-AN-ENR-NOR-CIP	

E: eritromicina; NA: ácido nalidíxico; ENR: enrofloxacin; DO: doxixiclina; TE: tetraciclina; NOR: norfloxacin; S: estreptomina; CIP: ciprofloxacina; SXT: sulfametoxazol/trimetoprima.

En base a lo propuesto por Magiorakos *et al.* (2012) se encontró que 14 cepas de SG provenientes de órganos de aves muertas de una misma granja de pollos parrilleros presentaron ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de tres categorías (fenicoles, fluoroquinolonas y aminoglucósidos), clasificándose como MDR y 2 cepas del mismo biotipo, pero aisladas de muestras de pool de clara y yema de una granja de ponedoras tuvieron ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de cuatro categorías (fenicoles, inhibidores de la vía del folato, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) por lo que también fueron clasificadas también como MDR. El resto de las cepas estudiadas no presentaron multirresistencia (MDR), resistencia extensa (XDR) o panresistencia (PDR).

3.2.DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM)

Teniendo en cuenta la totalidad de las cepas de *Salmonella* spp. enfrentadas a los antibióticos solo se encontró resistencia mayor del 80 % en el caso del antibiótico eritromicina. Por lo tanto, se realizó el ensayo para conocer la concentración mínima inhibitoria. Las 169 cepas fueron enfrentadas a 7 diferentes concentraciones de eritromicina. Para cada cepa se llevó a cabo un control positivo, es decir se inoculó cada cepa en un caldo que no contenía eritromicina, y, a su vez, se realizó un control negativo en el cual solo se colocó caldo. Las concentraciones ensayadas de ese antibiótico fueron 0, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 µg/ml.

En la **Tabla 64** se muestran los resultados obtenidos según cada serotipo, en los que se puede ver que todas las cepas resultaron resistentes a una concentración de eritromicina de 32 µg/ml o menos. Mientras que a medida que se aumentó la concentración del antibiótico el porcentaje de resistencia disminuyó; llegando a 67 % para la dosis de 512 µg/ml. Sin embargo, todas las cepas de ST resultaron resistentes a todas las dosis ensayadas, mientras que las cepas de SG resultaron ser más sensibles, llegando a un 96 % de sensibles en la mayor dosis ensayada. Por su parte, las cepas de SE tuvieron aumento de la sensibilidad a medida que aumentaba la dosis, pero solo se logró un 8 % de sensibilidad en la mayor dosis ensayada.

Tabla 64. Concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a eritromicina de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) y *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum (SG) provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros

Serotipo (Nº de cepas)	Resultado	% de cepas según concentración de eritromicina en µg/ml (Nº cepas)							
		0	8	16	32	64	128	256	512
SE (105)	Sensible	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	8 (8)
	Resistente	100 (105)	100 (105)	100 (105)	100 (105)	100 (105)	98 (103)	98 (103)	92 (97)
ST (14)	Sensible	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Resistente	100 (14)	100 (14)	100 (14)	100 (14)	100 (14)	100 (14)	100 (14)	100 (14)
SG (50)	Sensible	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (10)	20 (10)	24 (12)	96 (48)
	Resistente	100 (50)	100 (50)	100 (50)	100 (50)	80 (40)	80 (40)	76 (38)	4 (2)
TOTAL	Sensible	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (10)	7 (12)	8 (14)	33 (56)
	Resistente	100 (169)	100 (169)	100 (169)	100 (169)	94 (159)	93 (157)	92 (155)	67 (113)

3.3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS COMERCIALES UTILIZADOS EN GRANJAS

Las 169 cepas fueron enfrentadas a 22 productos comerciales que se utilizan en granjas avícolas para el tratamiento de enfermedades. Las cepas fueron resistentes a las tres dosis utilizadas de 4 productos: Certyl® Soluble (Carval), W-Tilmicosin 25 % (Weende SRL), Tilotar 100 (Lab. Scope) y Tilosina tartrato (Lab. Romikin SA), productos compuestos por tilmicosina o tilosina. La totalidad de las cepas fueron sensibles al producto Amoxicilina (Lab. Scope), cuyo ingrediente es amoxicilina, en las tres dosis probadas. Las respuestas de la sensibilidad frente al resto de los productos están detalladas en la **Tabla 65**. Los productos Amoxicilina-Colistina (Carval) y Terramicina (Zoetis) mostraron elevada sensibilidad para los tres serotipos en las dosis ensayadas, las mismas fueron entre el 90 y 100 %. Para el resto de los productos, se observó que a medida que disminuye la concentración de los productos antibióticos aumentaba el número de cepas resistentes para los tres serotipos.

Tabla 65. Respuestas de sensibilidad de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), S. ser. Typhimurium (ST) y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) a diferentes concentraciones de antibióticos comerciales utilizados en granjas avícolas

Producto	Dosis ensayada	% de cepas con respuesta sensible (S), intermedia (I) y resistente (R) frente a los diferentes productos (N° cepas)											
		SE (N=105)			ST (N=14)			SG (N=50)			TOTAL (N=169)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ave Ruminal (Ruminal)	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Recomendada	93 (98)	5 (5)	2 (2)	86 (12)	0 (0)	14 (2)	72 (36)	28 (14)	0 (0)	87 (146)	11 (19)	2 (4)
	Mitad	25 (26)	35 (37)	40 (42)	50 (7)	14 (2)	36 (5)	4 (2)	44 (22)	52 (26)	21 (35)	36 (61)	43 (73)
Vetantril-N Polvo soluble (Vetanco)	Doble	99 (104)	0 (0)	1 (1)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	28 (14)	4 (22)	68 (34)	78 (132)	1 (2)	21 (35)
	Recomendada	97 (102)	2 (2)	1 (1)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	24 (12)	0 (0)	76 (38)	76 (128)	1 (2)	23 (39)
	Mitad	97 (102)	2 (2)	1 (1)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	69 (116)	1 (2)	30 (51)
ENRO 10 (Agropecuaria MH)	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Recomendada	100 (105)	0 (0)	0 (0)	93 (13)	7 (1)	0 (0)	28 (14)	16 (8)	56 (28)	78 (132)	5 (9)	17 (28)
	Mitad	93 (98)	7 (7)	0 (0)	79 (11)	14 (2)	7 (1)	6 (3)	22 (11)	72 (36)	66 (112)	12 (20)	22 (37)
Floxagen Oral (Vetanco)	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Recomendada	95 (100)	5 (5)	0 (0)	79 (11)	14 (2)	7 (1)	28 (14)	28 (14)	44 (22)	74 (125)	12 (21)	14 (23)
	Mitad	95 (100)	2 (2)	3 (3)	79 (11)	14 (2)	7 (1)	20 (10)	4 (2)	76 (38)	72 (121)	4 (6)	25 (42)
Oxi-Scope 50 (Lab. Scope)	Doble	92 (97)	4 (4)	4 (4)	43 (6)	0 (0)	57 (8)	96 (48)	0 (0)	4 (2)	89 (151)	3 (4)	8 (14)
	Recomendada	80 (84)	8 (8)	12 (13)	36 (5)	0 (0)	64 (9)	92 (36)	0 (0)	8 (4)	80 (135)	5 (8)	15 (26)
	Mitad	50 (52)	19 (20)	31 (33)	21 (3)	0 (0)	79 (11)	40 (20)	48 (24)	12 (6)	44 (75)	26 (44)	30 (50)
Terramicina (Zoetis)	Recomendada	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Mitad	100 (105)	0 (0)	0 (0)	93 (13)	7 (1)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	99 (168)	1 (1)	0 (0)
Microflud F Solución (Vetanco)	Doble	98 (103)	2 (2)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	69 (117)	1 (2)	30 (50)
	Recomendada	48 (50)	41 (43)	11 (12)	79 (11)	0 (0)	21 (3)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	36 (61)	25 (43)	38 (65)
	Mitad	2 (2)	29 (30)	69 (73)	29 (4)	7 (1)	64 (9)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	4 (6)	18 (31)	78 (132)
Florfenicol Aves 10 (FACYT)	Doble	91 (96)	4 (4)	5 (5)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	65 (110)	2 (4)	33 (55)
	Recomendada	25 (26)	36 (38)	39 (41)	43 (6)	14 (2)	43 (6)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	19 (32)	24 (40)	57 (97)
	Mitad	0 (0)	11 (12)	89 (93)	0 (0)	14 (2)	86 (12)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	8 (14)	92 (155)
Suclortrim® 75	Doble	96 (101)	0 (0)	4 (4)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	96 (48)	0 (0)	4 (2)	96 (163)	0 (0)	4 (6)
	Recomendada	91 (96)	0 (0)	9 (9)	86 (12)	0 (0)	14 (2)	96 (48)	0 (0)	4 (2)	92 (156)	0 (0)	8 (13)
	Mitad	74 (78)	8 (8)	18 (19)	50 (7)	0 (0)	50 (7)	20 (10)	4 (2)	76 (38)	56 (95)	6 (10)	38 (64)

Continuación de la Tabla 65.

Producto	Dosis ensayada	% de cepas con respuesta sensible (S), intermedia (I) y resistente (R) frente a los diferentes productos (Nº cepas)											
		SE (N=105)			ST (N=14)			SG (N=50)			TOTAL (N=169)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Trimet (Nieser)	Doble	98 (103)	0 (0)	2 (2)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	96 (48)	0 (0)	4 (2)	98 (165)	0 (0)	2 (4)
	Recomendada	90 (95)	0 (0)	10 (10)	79 (10)	0 (0)	21 (4)	96 (48)	0 (0)	4 (2)	91 (153)	0 (0)	9 (16)
	Mitad	81 (85)	0 (0)	19 (20)	79 (10)	0 (0)	21 (4)	76 (38)	0 (0)	24 (12)	79 (133)	0 (0)	21 (36)
Colistina	Doble	76 (80)	21 (22)	3 (3)	93 (13)	7 (1)	0 (0)	80 (40)	16 (8)	4 (2)	79 (133)	18 (31)	3 (5)
	Recomendada	27 (28)	68 (71)	6 (6)	79 (11)	14 (2)	7 (1)	12 (6)	84 (42)	4 (2)	27 (45)	68 (115)	5 (9)
	Mitad	2 (2)	51 (54)	47 (49)	79 (11)	14 (2)	7 (1)	0 (0)	56 (28)	44 (22)	8 (13)	50 (84)	43 (72)
Valosin 425 (Vetanco)	Doble	2 (2)	0 (0)	98 (103)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	1 (2)	0 (0)	99 (167)
	Recomendada	0 (0)	2 (2)	98 (103)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	1 (2)	99 (167)
	Mitad	0 (0)	2 (2)	98 (103)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	1 (2)	99 (167)
Fosbac Plus T (Benson)	Doble	4 (4)	0 (0)	96 (101)	7 (1)	0 (0)	93 (13)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	3 (5)	0 (0)	97 (164)
	Recomendada	0 (0)	4 (4)	96 (101)	0 (0)	7 (1)	93 (13)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	3 (5)	97 (164)
	Mitad	0 (0)	4 (4)	96 (101)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	2 (4)	98 (165)
Agrocolixina (Agropecuaria MH)	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Recomendada	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Mitad	75 (79)	24 (25)	1 (1)	79 (11)	21 (3)	0 (0)	62 (31)	38 (19)	0 (0)	71 (121)	28 (47)	1 (1)
Amoxicilina Colistina (Carval)	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Recomendada	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Mitad	96 (101)	4 (4)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	92 (46)	8 (4)	0 (0)	95 (161)	5 (8)	0 (0)
Doxiclistina (Weende SRL)	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	96 (48)	4 (2)	0 (0)	99 (167)	1 (2)	0 (0)
	Recomendada	95 (100)	5 (5)	0 (0)	72 (10)	14 (2)	14 (2)	96 (48)	0 (0)	4 (2)	93 (158)	4 (7)	2 (4)
	Mitad	31 (33)	67 (70)	2 (2)	57 (8)	29 (4)	14 (2)	72 (36)	24 (12)	4 (2)	77 (158)	86 (7)	6 (4)
Probird Soluble (Ezegab)m	Doble	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
	Recomendada	98 (103)	2 (2)	0 (0)	93 (13)	0 (0)	7 (1)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	98 (166)	1 (2)	1 (1)
	Mitad	38 (40)	51 (54)	10 (11)	71 (10)	22 (3)	7 (1)	92 (46)	8 (4)	0 (0)	57 (96)	36 (61)	7 (12)

3.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A OTROS ANTIMICROBIANOS

En la **Tabla 66** se muestran los porcentajes de cepas sensibles, con resistencia intermedia y resistencia de los tres serotipos a la lisozima y los aceites esenciales de romero, orégano y espartillo. Todas las cepas resultaron resistentes a las concentraciones ensayadas de lisozima. Mientras que los aceites esenciales mostraron valores variables según el tipo de aceite. El aceite esencial de orégano logró inhibir el crecimiento de todas las cepas ensayadas, mientras que el aceite esencial de espartillo logro inhibir a todas las cepas pertenecientes a los serotipos de Gallinarum y Typhimurium y al 95 % de las cepas de SE, con un bajo porcentaje de resistencia (2 %) para este aceite esencial y este último serotipo. Por otro lado, el aceite esencial de romero mostró resultados de sensibilidad menor que los aceites esenciales de orégano y espartillo, 27, 14 y 4 % para las cepas de SE, ST y SG, respectivamente. A su vez, se encontró que el 81 % de las cepas estudiadas resultaron resistentes a dicho aceite esencial, con el valor más alto de resistencia para SG, con un porcentaje del 96 %.

Tabla 66. Respuesta de sensibilidad de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), S. ser. Typhimurium (ST) y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) a diferentes antimicrobianos

Productos	Dosis ensayada	% de cepas con respuesta sensible (S), intermedia (I) y resistente (R) frente a los diferentes productos (Nº de cepas)											
		SE (N=105)			ST (N=14)			SG (N=50)			Total (N=169)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Lisozima	7,0 %	0 (0)	0 (0)	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)
	3,5 % ¹	0 (0)	0 (0)	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)
	1,75 %	0 (0)	0 (0)	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)
Aceite esencial romero	Puro	27 (28)	0 (0)	73 (77)	14 (2)	0 (0)	86 (12)	4 (2)	0 (0)	96 (48)	19 (32)	0 (0)	81 (137)
Aceite esencial orégano	Puro	100 (105)	0 (0)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	100 (169)	0 (0)	0 (0)
Aceite esencial espartillo	Puro	95 (100)	2 (2)	3 (3)	100 (14)	0 (0)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	0 (0)	97 (164)	1 (2)	2 (3)

¹Concentración de lisozima que se encuentra en la clara de los huevos de gallina (Abdou *et al.*, 2013).

3.5. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DESINFECTANTES

En la **Tabla 67** se muestra la mínima concentración de cada desinfectante ensayado que se necesitó para inhibir el 100 % de los tres serotipos ensayados. Las cepas de SE y ST coincidieron en la CIM en todos los desinfectantes ensayados, mientras que en el caso de SG los desinfectantes solución de cresol al 50 % (Faeve); amonio 50 (Nieser); vinagri plus (Diversey) y pursue (Amway) mostraron CIM menores que los encontrados para los serotipos Enteritidis y Typhimurium y el resto de los desinfectantes coincidieron con las CIM mostradas para los serotipos Enteritidis y Typhimurium. De 17 productos desinfectantes, en 16 de ellos se comprobó que la dosis propuesta por el fabricante fue suficiente para inhibir el 100 % de las cepas de *Salmonella* spp. ensayadas. Mientras que para el producto iodopovidona (Faeve) se encontró que ninguna dosis fue suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. En este ensayo se fijó una dosis máxima de 4 % v/v, mientras que el fabricante recomienda una dosis de 0,1-0,5 % v/v.

Los valores de CIM para los desinfectantes que tiene como principio activo a los amonios cuaternarios (benzalcon forte, FF46 amonio, amonio 50, X905, pursue y ruminal 50) fueron de entre 0,01 y 0,125 % v/v para los serotipos Enteritidis y Typhimurium y de entre 0,005 y 0,0625 % v/v para el serotipo Gallinarum. A su vez, aquellos desinfectantes que en su composición tienen a amonios cuaternarios y otros compuestos desinfectantes (TH4, vinagri plus, glutavet, niesser squad, X5) mostraron valores de CIM de entre 0,0625 y 0,78125 % v/v para los serotipos Enteritidis y Typhimurium y de entre 0,05 y 0,78125 % v/v para el serotipo Gallinarum. Por otro lado, los desinfectantes que contienen cresoles en su composición (solución de cresol al 50 %, solución de cresol al 50 % nueva formulación, nieser cresl 400) mostraron valores de CIM de 0,125 y 0,250 % v/v para los tres serotipos ensayados. No se encontró diferencia entre los desinfectantes solución de cresol al 50 % y solución de cresol al 50 % - nueva formulación en cuanto a la dosis mínima para inhibir las cepas de los serotipos Enteritidis y Typhimurium.

Tabla 67. Concentración inhibitoria mínima (CIM) necesaria de los productos desinfectantes para inhibir el 100 % de los aislamientos de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), S. ser. Typhimurium (ST) y S. ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros

Desinfectante Comercial	CIM (% v/v)		
	SE	ST	SG
Benzalcon Forte (Faeve)	0,01	0,01	0,01
Iodopovidona (Faeve)	>4	>4	>4
Solución de cresol al 50 % (Faeve)	0,25	0,25	0,125
Solución de cresol al 50 % - Nueva formulación (Faeve)	0,25	0,25	0,25
TH4 (Biotay-Phibro)	0,0625	0,0625	0,0625
Formol 37 % (Nieser)	0,125	0,125	0,125
X5 (Bimex)	0,125	0,125	0,125
FF46 Amonio (Anjober SRL)	0,05	0,05	0,05
Amonio 50 (Nieser)	0,01	0,01	0,005
Nieser CRESL 400 (Nieser)	0,125	0,125	0,125
Nieser Squad (Nieser)	0,78125	0,78125	0,78125
Ruminal 50 (Ruminal)	0,01	0,01	0,01
Vinagri Plus (Diversey)	0,1	0,1	0,05
Glutavet (Vetser S.A.)	0,2	0,2	0,2
X905 (Farmabase)	0,05	0,05	0,05
Pursue (Amway)	0,125	0,125	0,0625
Agua lavandina (Ayudín®)	5	5	5

En la **Tabla 68** se pueden ver los resultados obtenidos por serotipo con respecto a las 7 diluciones ensayadas por desinfectante. Los desinfectantes TH4 (Biotay-Phibro), formol 37 % (Nieser), FF46 amonio (Anjober SRL), Nieser squad (Nieser) y X905 (Farmabase) mostraron porcentajes de sensibilidad del 100 % para todas las dosis y serotipos ensayados. La dosis menor ensayada fue de 0,0625 % v/v para el producto TH4 (Biotay-Phibro), 0,125 % v/v para el formol 37 % (Nieser), 0,05 % v/v para el FF46 amonio (Anjober SRL) y X905 (Farmabase) y 0,078125 % v/v para el Nieser squad (Nieser). Salvo para el caso del producto iodopovidona (Faeve), que no logró inhibir el crecimiento de ninguna cepa de *Salmonella* spp. en las dosis ensayadas, en general para los demás desinfectantes, a medida que se aumentó la dosis del producto, el porcentaje de sensibilidad se incrementó en los 3 serotipos utilizados.

Tabla 68. Sensibilidad de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *S. ser. Typhimurium* (ST) y *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum (SG) a diferentes concentraciones de desinfectantes comerciales utilizados en granjas avícolas y viviendas. S=sensible; R= resistente

Desinfectante comercial	Dosis ensayada (% v/v)	% de cepas sensibles según el tipo de serovar (nº cepas)							
		SE (N=105)		ST (N=14)		SG (N=50)		Total (N=169)	
		S	R	S	R	S	R	S	R
Iodopovidona	4	0 (0)	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)
Solución de cresol al 50 %	0,0625	45 (47)	55 (58)	57 (8)	43 (6)	96 (48)	4 (2)	60 (101)	40 (68)
	0,125	99 (104)	1 (1)	14 (2)	86 (12)	100 (50)	0 (0)	98 (166)	2 (3)
	0,25	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Solución de cresol al 50 % (Nueva formulación)	0,0625	37 (39)	63 (63)	79 (11)	21 (3)	92 (46)	8 (4)	68 (115)	32 (54)
	0,125	69 (72)	31 (33)	50 (7)	50 (7)	96 (48)	4 (2)	75 (127)	25 (42)
	0,25	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Nieser CRESL 400	0,03125	0 (0)	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)
	0,0625	20 (21)	80 (84)	64 (9)	36 (5)	96 (48)	4 (2)	83 (141)	17 (28)
	0,125	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Formol 37%	0,125	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Agua lavandina	1,25	0 (0)	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)
	2,5	2 (2)	98 (103)	14 (2)	86 (12)	76 (38)	24 (12)	25 (42)	75 (127)
	5	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Benzalcon Forte	0,005	46 (48)	54 (57)	57 (8)	43 (6)	96 (48)	4 (2)	62 (104)	38 (65)
	0,01	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
FF46 Amonio	0,05	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Amonio 50	0,0025	0 (0)	100 (105)	0 (0)	100 (14)	76 (38)	24 (12)	22 (38)	78 (131)
	0,005	6 (6)	94 (99)	93 (13)	7 (1)	100 (50)	0 (0)	96 (162)	4 (7)
	0,01	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)

Continuación de la Tabla 68.

Desinfectante comercial	Dosis ensayada (% v/v)	% de cepas sensibles según el tipo de serovar (nº cepas)							
		SE (N=105)		ST (N=14)		SG (N=50)		Total (N=169)	
		S	R	S	R	S	R	S	R
X905	0,05	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Pursue	0,0625	86 (90)	14 (15)	86 (12)	14 (2)	100 (50)	0 (0)	90 (152)	10 (17)
	0,125	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Ruminal 50	0,005	36 (38)	64 (67)	7 (1)	93 (13)	96 (48)	4 (2)	51 (87)	49 (82)
	0,01	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
TH4	0,0625	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Vinagri Plus	0,025	0 (0)	100 (105)	0 (0)	100 (14)	52 (26)	48 (24)	15 (26)	85 (143)
	0,05	58 (61)	42 (44)	7 (1)	93 (13)	100 (50)	0 (0)	66 (112)	34 (57)
	0,1	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Glutavet	0,05	0 (0)	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)
	0,1	69 (72)	31 (33)	7 (1)	93 (13)	96 (48)	4 (2)	49 (82)	51 (87)
	0,2	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
Nieser Squad	0,78125	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)
X5	0,03125	2 (2)	98 (103)	0 (0)	100 (14)	28 (14)	72 (36)	9 (16)	91 (153)
	0,0625	7 (7)	93 (98)	7 (1)	93 (13)	96 (48)	4 (2)	33 (56)	67 (113)
	0,125	100 (105)	0 (0)	100 (14)	0 (0)	100 (50)	0 (0)	100 (169)	0 (0)

3.6.EFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE *SALMONELLA* SPP. EN BIOPELÍCULAS EN DIFERENTES SUPERFICIES

En el estudio de la interacción entre los 17 desinfectantes probados y las cepas de *Salmonella* spp. con distintas capacidades de formar biopelículas en superficies de aluminio (Tabla 58), se observó que, en todos los casos, las dosis evaluadas de los desinfectantes (recomendada por el fabricante, la mitad y el doble de esta dosis) lograron inhibir el crecimiento de todas las cepas de *Salmonella* spp. hasta alcanzar un recuento de log UFC/disco $<1,6$. En la **Tabla 69** se pueden ver los recuentos obtenidos de las cepas sin el agregado de los desinfectantes (0 % v/v) para la superficie de aluminio. Se observó para este caso que los recuentos de las cepas sin el agregado de los desinfectantes fueron mayores y significativamente diferentes para ambos serotipos en las cepas productoras de biopelículas.

Y por otro lado en la **Tabla 70** se pueden ver los recuentos obtenidos para cada dilución probada sobre la cama de pollos parrilleros. Se observó que los recuentos de las cepas sin el agregado de los desinfectantes (0 % v/v) fueron mayores y significativamente diferentes para ambos serotipos en las cepas productoras de biopelículas. Para 10 productos desinfectantes (solución de cresol al 50 %; solución de cresol al 50 % - nueva formulación; TH4; formol 37 %; X5; Nieser squad; vinagri plus; glutavet; X905 y agua lavandina) las dosis probadas de los mismos (recomendada, mitad y doble) lograron inhibir el crecimiento de las cepas de *Salmonella* spp. a niveles de no detectable (log UFC/g $< 1,6$). Mientras que en los siete desinfectantes restantes, si bien lograron inhibir las cepas de *Salmonella* spp. ensayadas, el efecto sobre el crecimiento dependió de las cepas y concentración de los productos. En estos productos, tanto para las cepas productoras como las no productoras de biopelículas, a medida que aumentó la dosis del desinfectante disminuyó el recuento bacteriano. A mitad de dosis recomendada, solo 4 de estos productos desinfectantes no lograron disminuir el crecimiento de alguna de las cepas ensayadas: cepas SE, productora y no productora de biopelículas (amonio 50 y persue); SE no productora de biopelículas (benzalcon forte); y SE productora de biopelículas (FF 46 amonio). Sin embargo, todos los productos lograron disminuir el recuento bacteriano a la dosis recomendada por el fabricante y solo el producto ruminal 50 bajó la concentración bacteriana por debajo del valor detectable.

Tabla 69. Recuentos de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE) y S. ser. Typhimurium (ST) productoras y no productoras de biopelículas sobre aluminio esterilizado en los ensayos de desinfectante con dosis 0 % v/v. Los valores representan el promedio $\pm$ desvío estándar

Desinfectante	Recuento bacteriano (log UFC/disco)			
	SE		ST	
	No productora de biopelícula	Productora biopelícula	No productora biopelícula	Productora biopelícula
Benzalcon Forte (Faeve)	2,84 $\pm$ 0,09 ^a	3,24 $\pm$ 0,11 ^b	2,66 $\pm$ 0,08 ^a	3,91 $\pm$ 0,01 ^b
Iodopovidona (Faeve)	3,09 $\pm$ 0,02 ^a	3,49 $\pm$ 0,16 ^b	2,79 $\pm$ 0,16 ^a	3,62 $\pm$ 0,03 ^b
Solución de cresol al 50 % (Faeve)	3,14 $\pm$ 0,09 ^a	3,89 $\pm$ 0,02 ^b	2,69 $\pm$ 0,12 ^a	3,68 $\pm$ 0,10 ^b
Solución de cresol al 50 %- Nueva formulación (Faeve)	3,15 $\pm$ 0,08 ^a	3,72 $\pm$ 0,16 ^b	2,79 $\pm$ 0,16 ^a	3,64 $\pm$ 0,06 ^b
TH4 (Biotay-Phibro)	3,17 $\pm$ 0,05 ^a	3,83 $\pm$ 0,11 ^b	2,94 $\pm$ 0,06 ^a	4,02 $\pm$ 0,08 ^b
Formol 37 % (Nieser)	3,25 $\pm$ 0,08 ^a	3,84 $\pm$ 0,09 ^b	3,06 $\pm$ 0,02 ^a	3,84 $\pm$ 0,09 ^b
X5 (Bimex)	3,06 $\pm$ 0,02 ^a	3,55 $\pm$ 0,07 ^b	3,13 $\pm$ 0,11 ^a	3,84 $\pm$ 0,09 ^b
FF46 Amonio (Anjober SRL)	3,12 $\pm$ 0,12 ^a	3,62 $\pm$ 0,03 ^b	2,87 $\pm$ 0,05 ^a	3,66 $\pm$ 0,08 ^b
Amonio 50 (Nieser)	2,98 $\pm$ 0,14 ^a	3,89 $\pm$ 0,02 ^b	2,64 $\pm$ 0,06 ^a	3,94 $\pm$ 0,06 ^b
Nieser CRESL 400 (Nieser)	3,15 $\pm$ 0,08 ^a	4,06 $\pm$ 0,02 ^b	2,62 $\pm$ 0,03 ^a	3,99 $\pm$ 0,12 ^b
Nieser Squad (Nieser)	3,17 $\pm$ 0,05 ^a	3,66 $\pm$ 0,08 ^b	2,77 $\pm$ 0,18 ^a	3,58 $\pm$ 0,03 ^b
Ruminal 50 (Ruminal)	3,18 $\pm$ 0,17 ^a	3,69 $\pm$ 0,12 ^b	3,14 $\pm$ 0,09 ^a	3,84 $\pm$ 0,09 ^b
Vinagri Plus (Diversey)	3,17 $\pm$ 0,19 ^a	3,98 $\pm$ 0,11 ^b	3,04 $\pm$ 0,06 ^a	3,98 $\pm$ 0,14 ^b
Glutavet (Vetser S.A.)	3,32 $\pm$ 0,14 ^a	3,79 $\pm$ 0,18 ^b	2,81 $\pm$ 0,13 ^a	3,91 $\pm$ 0,01 ^b
X905 (Farmabase)	3,21 $\pm$ 0,13 ^a	3,81 $\pm$ 0,16 ^b	2,84 $\pm$ 0,09 ^a	3,98 $\pm$ 0,14 ^b
Pursue (Amway)	3,22 $\pm$ 0,11 ^a	3,92 $\pm$ 0,03 ^b	2,98 $\pm$ 0,14 ^a	4,01 $\pm$ 0,14 ^b
Agua lavandina (Ayudín®)	3,39 $\pm$ 0,16 ^a	3,94 $\pm$ 0,06 ^b	3,14 $\pm$ 0,09 ^a	3,89 $\pm$ 0,02 ^b

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma fila para el mismo serotipo son significativamente distintos ($p < 0,05$).

Tabla 70. Recuentos de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE) y S. ser. Typhimurium (ST) productoras y no productoras de biopelículas frente a las diferentes diluciones de los desinfectantes sobre cama de pollos parrilleros esterilizada. Los valores representan el promedio $\pm$ desvío estándar

Desinfectante	Dosis (% v/v)	Recuento bacteriano (log UFC/g)			
		SE		ST	
		No productora biopelícula	Productora biopelícula	No productora biopelícula	Productora biopelícula
Benzalcon Forte (Faeve)	0	3,32 $\pm$ 0,18 ^{aA}	3,87 $\pm$ 0,05 ^{bA}	3,55 $\pm$ 0,07 ^{aA}	3,95 $\pm$ 0,04 ^{bA}
	0,02	3,12 $\pm$ 0,04 ^{aA}	3,16 $\pm$ 0,07 ^{aB}	3,00 $\pm$ 0,13 ^{aB}	3,25 $\pm$ 0,07 ^{aB}
	0,04	2,55 $\pm$ 0,07 ^{aB}	3,08 $\pm$ 0,02 ^{bB}	ND ^C	2,72 $\pm$ 0,16 ^B
	0,08	1,99 $\pm$ 0,12 ^{aB}	2,95 $\pm$ 0,07 ^{bB}	ND ^C	2,29 $\pm$ 0,12 ^B
Iodopovidona (Faeve)	0	3,66 $\pm$ 0,03 ^{aA}	3,88 $\pm$ 0,06 ^{bA}	3,64 $\pm$ 0,06 ^{aA}	3,85 $\pm$ 0,07 ^{bA}
	0,25	2,62 $\pm$ 0,09 ^{aB}	2,79 $\pm$ 0,16 ^{aB}	2,97 $\pm$ 0,09 ^{aB}	3,02 $\pm$ 0,17 ^{aB}
	0,5	2,19 $\pm$ 0,16 ^{aB}	2,43 $\pm$ 0,18 ^{aB}	ND ^C	ND ^C
	1,0	ND ^{1C}	ND ¹	ND ^C	ND ^C
Solución de cresol al 50 % (Faeve)	0	3,18 $\pm$ 0,07 ^{aA}	3,49 $\pm$ 0,09 ^{bA}	3,87 $\pm$ 0,06 ^a	4,14 $\pm$ 0,09 ^b
	$\geq 1,0$	ND ^B	ND ^B	ND ^C	ND ^C
Solución de cresol al 50 % - Nueva formulación (Faeve)	0	3,52 $\pm$ 0,02 ^{aA}	4,06 $\pm$ 0,05 ^{bA}	3,14 $\pm$ 0,09 ^{aA}	3,58 $\pm$ 0,03 ^b
	$\geq 1,0$	ND ^B	ND ^B	ND ^B	ND ^C
TH4 (Biotay-Phibro)	0	3,59 $\pm$ 0,12 ^{aA}	3,86 $\pm$ 0,07 ^{bA}	3,76 $\pm$ 0,02 ^a	3,91 $\pm$ 0,05 ^{bA}
	$\geq 0,25$	ND ^B	ND ^B	ND ¹	ND ^B
Formol 37 % (Nieser)	0	3,52 $\pm$ 0,09 ^{aA}	3,81 $\pm$ 0,10 ^{bA}	3,58 $\pm$ 0,04 ^{aA}	3,95 $\pm$ 0,14 ^{bA}
	$\geq 0,5$	ND ^B	ND ^B	ND ^B	ND ^B
X5 (Bimex)	0	3,57 $\pm$ 0,10 ^{aA}	3,93 $\pm$ 0,07 ^{bA}	3,66 $\pm$ 0,02 ^{aA}	3,94 $\pm$ 0,05 ^{bA}
	$\geq 0,125$	ND ^B	ND ^B	ND ^B	N ^B
FF46 Amonio (Anjober SRL)	0	3,40 $\pm$ 0,14 ^{aA}	3,99 $\pm$ 0,11 ^{bA}	3,81 $\pm$ 0,09 ^{aA}	3,89 $\pm$ 0,02 ^{bA}
	0,2	2,62 $\pm$ 0,03 ^{aB}	3,71 $\pm$ 0,10 ^{bA}	2,99 $\pm$ 0,12 ^{aB}	3,22 $\pm$ 0,11 ^{aB}
	0,4	ND ^C	ND ^B	ND ^C	2,35 $\pm$ 0,21 ^B
	0,8	ND ^C	ND ^B	ND ^C	ND ^C
Amonio 50 (Nieser)	0	3,70 $\pm$ 0,02 ^{aA}	3,84 $\pm$ 0,09 ^{bA}	3,73 $\pm$ 0,07 ^{aA}	3,98 $\pm$ 0,11 ^{bA}
	0,01	3,55 $\pm$ 0,07 ^{aA}	3,57 $\pm$ 0,10 ^{aA}	2,55 $\pm$ 0,07 ^{aB}	3,04 $\pm$ 0,06 ^{bB}
	0,02	2,99 $\pm$ 0,12 ^{aB}	2,68 $\pm$ 0,10 ^{aB}	ND ^C	ND ^C
	0,04	ND ^C	1,75 $\pm$ 0,21 ^B	ND ^C	ND ^C

Continuación de la Tabla 70.

Desinfectante	Dosis (% v/v)	Recuento bacteriano (log UFC/g)			
		SE		ST	
		No productora biopelícula	Productora biopelícula	No productora biopelícula	Productora biopelícula
Nieser CRESL 400 (Nieser)	0	3,74 ± 0,13 ^{aA}	3,76 ± 0,02 ^{bA}	3,71 ± 0,05 ^{aA}	3,89 ± 0,02 ^{bA}
	0,125	2,55 ± 0,07 ^{aB}	2,64 ± 0,06 ^{aB}	2,99 ± 0,12 ^{aB}	3,11 ± 0,06 ^{aB}
	≥0,250	ND ^C	ND ^C	ND ^C	ND
Nieser Squad (Nieser)	0	3,24 ± 0,06 ^a	3,62 ± 0,09 ^{bA}	3,60 ± 0,14 ^{aA}	3,83 ± 0,04 ^b
	≥25	ND ^B	ND ^B	ND ^B	ND ^C
Ruminal 50 (Ruminal)	0	3,80 ± 0,08 ^{aA}	4,01 ± 0,10 ^{bA}	3,76 ± 0,02 ^{aA}	3,84 ± 0,02 ^{bA}
	0,02	2,19 ± 0,16 ^{aB}	3,44 ± 0,09 ^{bB}	2,97 ± 0,09 ^{aB}	3,22 ± 0,11 ^{aB}
	0,04	ND ^C	3,14 ± 0,08 ^B	ND ^C	ND ^C
	0,08	ND ^C	1,99 ± 0,12	ND ^C	ND ^C
Vinagri Plus (Diversey)	0	3,17 ± 0,03 ^{aA}	3,80 ± 0,08 ^b	3,42 ± 0,09 ^{aB}	3,74 ± 0,06 ^b
	≥0,2	ND ^B	ND ¹	ND ^C	ND ^C
Glutavet (Vetser S.A)	0	3,31 ± 0,05 ^{aA}	3,72 ± 0,11 ^{bA}	3,62 ± 0,06 ^{aA}	4,04 ± 0,04 ^b
	≥0,2	ND ^B	ND ^B	ND ^B	ND ^C
X905 (Farmabase)	0	3,12 ± 0,14 ^{aA}	3,65 ± 0,14 ^{bA}	3,80 ± 0,06 ^a	4,04 ± 0,06 ^b
	≥0,2	ND ^B	ND ^B	ND ¹	ND ^C
Pursue (Amway)	0	3,97 ± 0,04 ^{aA}	4,21 ± 0,07 ^{bA}	3,70 ± 0,08 ^{aA}	3,95 ± 0,01 ^{bA}
	0,25	3,82 ± 0,06 ^{aA}	3,84 ± 0,09 ^{aA}	3,22 ± 0,11 ^{aB}	3,55 ± 0,07 ^{aB}
	0,5	3,37 ± 0,09 ^{aB}	3,48 ± 0,04 ^{aB}	ND ^C	ND ^C
	1,0	2,61 ± 0,15 ^{aB}	3,29 ± 0,12 ^{bB}	ND ^C	ND ^C
Agua lavandina (Ayudín®)	0	3,65 ± 0,12 ^{aA}	4,04 ± 0,11 ^{bA}	3,54 ± 0,11 ^{aA}	3,92 ± 0,06 ^{bA}
	≥2,5	ND ^B	ND ^B	ND ^B	ND ^B

¹ ND: no detectado (<1,6).

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma fila para el mismo serotipo son significativamente distintos (p< 0,05).

^{A,B,C} Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente distintos para cada desinfectante (p< 0,05).

4. DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la susceptibilidad de antimicrobianos a cepas de SE, ST y SG provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos. En primera instancia se estudió la susceptibilidad a 30 antibióticos y los resultados indicaron que el 100 % de los aislamientos fueron resistentes a la eritromicina, un antibiótico perteneciente a la familia de los macrólidos. La eritromicina es un bacteriostático, en estos agentes se produce resistencia cruzada de la bacteria por alteraciones en la permeabilidad celular, producción de acetiltransferasa y reacciones de metilación de rRNA, evitando la inserción del medicamento al ribosoma. Del mismo modo, la membrana externa de los Gram negativos supone una barrera natural a este antibiótico, disminuyendo su permeabilidad y la fijación de las moléculas del antimicrobiano a sus receptores. Esto permite que muchas bacterias de este tipo sean insensibles a este antimicrobiano (Vaara, 1993; Gomes *et al.*, 2016; Chambers, 2006; Nakajima, 1999) y las enterobacterias son intrínsecamente resistentes a la gran mayoría de los macrólidos. Datos reportados por otros autores (Taddele *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013) informaron el mismo porcentaje de resistencia. A su vez, en este trabajo se estudió la concentración mínima inhibitoria de este antibiótico encontrándose que, con la concentración máxima ensayada, 512 µg/ml, solo el 33 % del total de las cepas resultaron ser sensible confirmando así la resistencia encontrada con el ensayo de difusión por disco e indicando que estas cepas no pertenecen a un tipo de vacuna viva de SE y ST, que son sensibles a este antibiótico (Ministerio de Sanidad, España, 2018; 2020). Por otro lado, antibióticos de la misma familia que la eritromicina, como tilosina (Tilotar 100, Tilosina tartrato), tilmicosina (*CERTYL® SOLUBLE*, W-TILMICOSIN 25 %), y tilvalosina (Valosin 425) resultaron ser resistentes a las cepas de *Salmonella* spp. ensayadas. Esto concuerda con lo informado por otros autores con respecto a los antibióticos de la familia macrólidos, salvo azitromicina, que las bacterias gram negativas presentan resistencia intrínseca a los mismos por falta de permeabilidad de la pared celular (Mercer, 2022).

En referencia al resto de los antibióticos ensayados, la resistencia en *Salmonella* spp. se centra principalmente en el aumento general del número de cepas resistentes, la propagación multirresistente de clones resistentes o genes de resistencia y la disminución de la eficacia de algunas clases de antimicrobianos recientemente introducidas en la práctica médica y veterinaria (Chiu *et al.*, 2002; Wray y Wray, 2000). La mayoría de las tendencias no se identificaron en el presente estudio. Los científicos consideran que la resistencia a antibióticos es más preocupante en el grupo de las quinolonas, tan usado en veterinaria, además de las cefalosporinas de tercera generación. Países como Japón sólo permiten el uso de quinolonas en animales, cuando éste sea el único tratamiento de elección, siempre bajo la supervisión de un médico zootecnista y durante un tiempo máximo de cinco días. Dado que las fluoroquinolonas son uno de los antimicrobianos de elección para tratar las infecciones graves producidas por *Salmonella* spp. en humanos, una disminución en la sensibilidad a fluoroquinolonas puede tener importantes implicancias clínicas (Zúñiga y Caro, 2022).

La resistencia a estos antibióticos es altamente problemática debido a su eficacia en el tratamiento de enfermedades graves causadas por microorganismos multirresistentes. Aunque no se ha demostrado completamente su contribución a la aparición de cepas multirresistentes en humanos, su influencia es muy significativa. Por lo tanto, es necesario implementar medidas a nivel preventivo para maximizar el beneficio terapéutico de este grupo de antibióticos y reducir al mínimo la amenaza de la resistencia. Dado que las fluoroquinolonas son uno de los antimicrobianos de elección para tratar las infecciones graves producidas por *Salmonella* spp. en humanos, una disminución en la sensibilidad a fluoroquinolonas puede tener importantes implicancias clínicas (Orden Gutiérrez y De La Fuente, 2001; Helms *et al.*, 2002). En términos generales, en este estudio de tesis se encontró un mayor número de cepas de *Salmonella* spp. resistente a los antibióticos del grupo de las quinolonas; con valores de resistencia de 21 % para la norfloxaxina (quinolona de segunda generación) y 34 % para el ácido nalidíxico (quinolona de primera generación). Normalmente, el antibiótico no influye en la aparición de resistencias salvo algunos grupos como las quinolonas, cuya capacidad mutágena incrementa la tasa de mutación en la bacteria, provocando un estado de estrés que la hace más susceptible de sufrir estas mutaciones. Una vez que la bacteria es resistente al antibiótico es capaz de transmitir su resistencia de forma vertical a su descendencia o de forma horizontal a otras bacterias que pueden ser de distinta especie e incluso género (Taddei *et al.*, 1997). Por otro lado, en este estudio no se encontró resistencia al grupo de antibióticos pertenecientes a las cefalosporinas. Este grupo se debe considerar de máxima prioridad debido a la aparición de resistencia, es por ello que la OMS, OIE y FAO consideran a las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación como uno de los medicamentos antimicrobianos de máxima prioridad para la elaboración de estrategias en relación al análisis de riesgo con la resistencia a los antimicrobianos (FAO/OIE/OMS, 2011, OMS, 2019). Scott *et al.* (2019) indicaron que una opción en el control eficaz contra determinados tipos de resistencia bacteriana sería interrumpir totalmente el uso de las cefalosporinas sistémicas de tercera y cuarta generación, o restringirlo a determinadas circunstancias específicas.

Para el serotipo Enteritidis se encontraron bajos niveles de resistencia a los antibióticos ensayados, sólo un 5 % de las cepas de este serotipo fueron resistentes al ácido nalidíxico, mientras que para el serotipo Typhimurium se encontraron mayores niveles de resistencia: 57 % a las tetraciclinas, 43 % a la estreptomina y 21 % al ácido nalidíxico. Estos resultados no coinciden con lo publicado por Castro-Vargas *et al.* (2020), quienes informaron altos niveles de resistencia al ácido nalidíxico y ampicilina, 80,3 % y 64,8 %, respectivamente en cepas de SE y ST. A su vez, encontraron niveles medios de resistencia 33 %, 29,4 % y 39,3 % a estreptomina, amoxicilina/ácido clavulánico y trimetoprima/sulfametoxazol, respectivamente. Para las cepas de SG, este trabajo de tesis encontró resistencia al grupo de las quinolonas, con la totalidad de las cepas resistentes al ácido nalidíxico y del 72 % y 10 % para la norfloxaxina y ciprofloxacina. Estos antimicrobianos se han utilizado con éxito para tratar las salmonelosis, incluidas las infecciones causadas por cepas multirresistentes (Barnass *et al.*, 1990; Reina *et al.*, 1993). Seo *et al.* (2019) estudiaron la resistencia antimicrobiana de aislamientos de SG de pollos en Corea y observaron altas tasas de resistencia a ácido nalidíxico (78,5 %), gentamicina (52,3 %) y ciprofloxacina (26,9 %).

Así también, Kang *et al.* (2010) también observaron resistencia a ácido nalidíxico y fluoroquinolonas en la mayoría de los aislamientos de SG. La OMS advierte que el uso de las fluoroquinolonas en animales para el consumo alimentario ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes a ciprofloxacina, entre ellas bacterias como *Salmonella* spp, causando infecciones humanas difíciles de tratar (OPS/OMS, 2011).

En cuanto a la resistencia a la colistina, en este trabajo de tesis no se encontraron cepas resistentes tanto en la prueba de discos como con antibióticos comerciales que tenían colistina o mezclas de este antibiótico con otro. Dado que la colistina y sus sales se encuentra clasificado por la OMS como de “RESERVA” debido a su importancia como herramienta terapéutica de última elección en unidades de cuidados intensivos en humanos, Argentina prohibió la elaboración, distribución, importación, uso y tenencia de productos veterinarios que contengan en su formulación el principio activo colistina y sus sales en el 2019 (SENASA, 2019). Los ensayos de esa parte de la tesis fueron realizados antes de esa resolución, por eso había productos comerciales con colistina.

Muchos microorganismos presentan resistencia a múltiples antibióticos, y debido a que la diseminación de genes de resistencia puede ocurrir entre cepas bacterianas de distinta especie y origen, el impacto en Salud pública es relevante (Rice, 2000; Van den Bogaard *et al.*, 2002). Con respecto al IRMA, diversos autores reportaron valores mayores a 0,21 en cepas de *Salmonella* spp. móviles aisladas de aves, productos avícolas y frigoríficos (Cloeckaert y Schwarz, 2001; Bada-Alamedji *et al.*, 2006; Elgroud *et al.*, 2008; Dominguez, 2016; Vuthy *et al.*, 2017; Cesur *et al.*, 2019). En este capítulo de tesis, se observó que las cepas de *Salmonella* spp., aisladas de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos, presentaron valores de IRMAs más bajos (entre 0,03 y 0,17). Krumpferman (1983) indicó que valores de índices de IRMA por encima de 0,20 indican alto riesgo de contaminación potencialmente peligroso para el humano, es decir, presencia de microorganismos multirresistentes. Basado en ello, en este trabajo de tesis los índices de IRMA estuvieron por debajo de ese valor, por lo que no existe riesgo de presencia de cepas multirresistentes. Sin embargo, la presencia de 16 cepas de SG como MDR resalta el valor de tomar distintos criterios para el estudio de multirresistencia.

Con respecto a los otros compuestos antimicrobianos, los resultados indicaron que todas las cepas fueron resistentes a las concentraciones de lisozima ensayadas. Esto es debido a que es casi inactiva frente a microorganismos Gram-negativos, como *Salmonella* spp., por la dificultad de acceder al peptidoglicano que se encuentra protegido por la membrana externa. Esta propiedad de hidrolizar el peptidoglicano se conoce como actividad neuraminidasa o muramidasa (Gálvez-Irqui *et al.*, 2020). La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular. El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, un fenómeno denominado lisis. También es importante destacar que en las bacterias gram positivas el peptidoglicano representa alrededor del 90 % de la pared celular, mientras que en las gram negativas apenas abarca el 10 % (Carrillo, 2013).

Por otro lado, los aceites esenciales de orégano y espartillo fueron efectivos contra las cepas de *Salmonella* spp. ensayadas. Aunque hay distintos trabajos de los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales del orégano (Hulankova *et al.*, 2013; Pesavento *et al.*, 2015; Pires de Campo *et al.*, 2022, Evangelista-Martínez *et al.*, 2018; Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Toso *et al.*, 2023), no existe información con cepas regionales de *Salmonella* spp. Además, hay muy escasa información del efecto antimicrobiano del aceite de espartillo sobre cepas de *Salmonella* spp. Se determinaron valores elevados de resistencia para los aceites esenciales de romero en contraposición de lo encontrado por Castaño *et al.* (2010), quienes evidenciaron una alta actividad antibacteriana del aceite esencial contra diferentes cepas de *Salmonella* spp., con halos de inhibición entre 19,8 y 25 mm. Esta diferencia pudo haberse debido a la variación en la composición del aceite esencial utilizado en esta investigación y por el método utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana, el cual no fue el mejor, pues se ha reportado que el método de difusión en agar es inadecuado para aceites esenciales, debido a que sus componentes volátiles se pueden evaporar con el solvente durante el tiempo de incubación, mientras que sus componentes menos solubles no se difunden bien en el agar. No obstante, es la técnica más común para evaluar actividad antibacteriana de un aceite esencial porque es más fácil de llevarla a cabo y requiere cantidades pequeñas del aceite esencial (Rincon, 2007).

En referencia a los desinfectantes ensayados, solo uno de ellos fue ineficaz en el 100 % de las cepas en la concentración recomendada por el fabricante. La iodopovidona (Faeve) es considerada un antiséptico de amplio espectro de actividad, que presenta la actividad microbicida del yodo, siendo activa frente a bacterias (Gram + y Gram -), micobacterias, hongos, virus, protozoos y esporas, pero la actividad antimicrobiana de la povidona yodada se ve afectada por el pH del medio, siendo óptima en condiciones ácidas (Font, 2001). Aunque no se midió el pH del medio de cultivo poscrecimiento de las cepas bacterianas, la iodopovidona fue el único producto desinfectante que no logró inhibir al 100 % de las cepas de *Salmonella* spp. en la concentración recomendada por el fabricante. En el resto de los desinfectantes se encontraron diferencias en los porcentajes de sensibilidad para las diferentes concentraciones y serotipos para en el mismo producto desinfectante, esto concuerda con trabajos previos en donde se observaron variaciones en la eficacia contra ST y SE de desinfectantes que tienen los mismos ingredientes activos (McLaren *et al.*, 2011, Drauch *et al.*, 2020).

Se conoce una variabilidad en la eficacia contra *Salmonella* spp. entre productos dentro del grupo químico de los cresoles (Gosling *et al.*, 2016). En este trabajo de tesis los productos que contenían cresoles en su composición mostraron ser eficaces contra los serotipos de *Salmonella* spp. ensayados. A su vez, los productos que contenían amonios cuaternarios o amonios cuaternarios y aldehídos en su composición mostraron los valores más bajos de CIM y no se evidenció diferencias entre ellos. De igual manera, otros autores (Martelli *et al.*, 2017, Mueller-Doblies *et al.* 2010), utilizando productos que contenían una combinación de aldehídos y compuestos de amonio cuaternario, disminuyeron la carga de *Salmonella* spp. de manera importante. Sin embargo, pueden ocurrir diferentes respuestas con otros

serotipos, como De Quadros *et al.* (2020) lo reportaron para *S. ser. Infantis*, aisladas de mataderos porcinos, con alta resistencia a este grupo de desinfectantes.

Comparando los resultados obtenidos sobre la superficie de aluminio y el ensayo realizado con las microdiluciones para determinar la CIM, se pudo ver que, en 15 de los 17 desinfectantes la dosis en las cuales los recuentos de los log resultaron menores a 1,6 UFC/disco, también lograron inhibir la totalidad de las cepas ensayadas. Sin embargo, el desinfectante iodopovidona (Faeve), que en el ensayo de determinación de la CIM no logró inhibir el crecimiento de las cepas ensayadas en ninguna dosis probada, inhibió el crecimiento de las cepas de *Salmonella* spp. inoculadas en el ensayo sobre aluminio, obteniéndose valores de recuento de log menor de 1,6 UFC/disco para todos los casos al doble de la dosis recomendada por el fabricante. Así también, en el caso del desinfectante agua lavandina (Ayudín®) las dosis ensayadas sobre aluminio lograron inhibir el crecimiento de las cepas con recuentos de log menor a 1,6 UFC/disco, siendo que en el ensayo de determinación de CIM la dosis de 2,5 % v/v no había logrado inhibir el 100 % de las cepas, mientras que las dosis más concentradas lograron inhibir el 100 % de las cepas. Esto podría deberse al pH del medio, siendo óptimo en condiciones ácidas (Font, 2001) o la carga bacteriana inicial.

Comparando los resultados de los siete desinfectantes en cama con los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución en placas, las respuestas fueron variables, dependiendo de la metodología y producto utilizado. Se conoce que existen factores que influyen en las reacciones entre los desinfectantes y las bacterias como la concentración del desinfectante, temperatura, pH y material extraño. Este último incluye materia orgánica, agentes de superficie y cationes. La disminución de la eficacia de los desinfectantes se debería a una reacción entre el desinfectante y el material extraño, en parte a una menor penetración a través de este último (Russell, 1999)

Las bacterias que forman biopelículas suelen mostrar una mayor resistencia a los antibióticos y desinfectantes en comparación con sus formas planctónicas. Además, se han identificado más de 45 genes cuya expresión difiere entre las bacterias en biopelículas y sus contrapartes planctónicas (Vidal *et al.*, 1997; Donlan y Costerton 2002; Sharma *et al.*, 2019; Maillard y Centeleghe, 2023). En este trabajo de tesis los ensayos con distintos desinfectantes frente a *Salmonella* spp. en biofilm demostraron que algunos de ellos fueron efectivos a concentraciones proporcionadas por los fabricantes, entre los cuales tales se encuentran el benzalcon forte, FF46 amonio, amonio 50, ruminal 50 y Pursue. Por ello, los ensayos *in vitro* realizados proporcionan datos importantes para mejorar el rendimiento de los procedimientos de limpieza y desinfección de las instalaciones contaminadas con *Salmonella* spp.

5. CONCLUSIONES

- ✓ La mayoría de las cepas de *Salmonella* spp., aisladas de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos, son sensibles *in vitro* a los antibióticos probados.
- ✓ Las cepas de *Salmonella* spp. ensayadas son resistentes a los antibióticos de la familia de los macrólidos, salvo azitromicina. Dentro de esta familia, estas cepas son resistentes a la eritromicina en concentraciones de 128 µg/ml o más, siendo las cepas de ST resistentes a concentraciones de 512 µg/ml de este antibiótico.
- ✓ La presencia de cepas resistentes a múltiples antibióticos de SG es una alerta y por lo tanto indica la importancia del monitoreo de la sensibilidad a los ATB en avicultura.
- ✓ La lisozima no es eficiente para la inhibición del crecimiento de las cepas ensayadas de *Salmonella* spp.
- ✓ Los aceites esenciales de orégano y espartillo son eficaces contra las cepas de *Salmonella* spp. provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- ✓ Las concentraciones de los desinfectantes recomendada por los fabricantes son eficaces para inhibir a las cepas de *Salmonella* spp. provenientes de granjas avícolas e hígados de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos.
- ✓ Las cepas de *Salmonella* spp. productoras de biopelículas son más resistentes a algunos de los desinfectantes.

DISCUSIÓN GENERAL

La salmonelosis es un problema de salud pública mundial y un desafío para la industria avícola Argentina, donde la producción avícola juega un papel fundamental. Este trabajo de tesis se enfocó en determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en la zona de mayor densidad de granjas de pollos parrilleros y gallinas de postura de la provincia de Entre Ríos, un área clave para la producción avícola Argentina. Se analizaron diferentes tipos de muestras para obtener una visión amplia de la situación, incluyendo la identificación de las serovariedades circulantes; encontrándose prevalencias de 62%, 46% y del 4,8 % en granjas de pollos parrilleros, granjas de gallinas ponedoras e hígados de pollos parrilleros obtenidos de mercados relacionados a frigoríficos de la provincia de Entre Ríos, respectivamente. Los serotipos de *Salmonella* spp. que se pudieron determinar fueron variables y el serotipo predominante resultó ser Enteritidis con un 13 % y 14 % para granjas de pollos parrilleros y granjas de gallinas ponedoras, respectivamente. Esta información es muy relevante, ya que aporta datos actualizados sobre los serotipos de *Salmonella* spp. circulantes en las zonas de mayor concentración de granjas avícolas en la provincia de Entre Ríos. Por otro lado, en hígados de pollos se pudieron aislar tanto ST como SE, lo que implica un riesgo para la salud pública en productos avícolas contaminados. Este estudio aporta información novedosa sobre la presencia de *Salmonella* spp. en hígados de pollo parrilleros en la provincia de Entre Ríos, ya que no existen datos publicados previamente sobre la prevalencia de esta bacteria en este tipo de tejido en la región.

Además, se investigó la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de *Salmonella* spp. de diferentes serovariedades, así como la efectividad de desinfectantes y aceites esenciales, lo que proporciona información crucial para el desarrollo de estrategias de control y prevención de la salmonelosis. La mayoría de las cepas de los serovares Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum resultaron ser sensibles *in vitro* a los antibióticos probados. Los estudios de resistencia a antibióticos se centran en el aumento general del número de cepas resistentes, la propagación de clones resistentes o genes de resistencia y la disminución de la eficacia de algunas clases de antibióticos recientemente introducidos en la práctica médica y veterinaria. Si bien lo antes descrito no se identificó en el presente estudio, es de suma importancia continuar con la vigilancia de la resistencia en producciones avícolas. Los aceites esenciales de orégano y espartillo son eficaces *in vitro* contra las cepas de los serovares Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum. A pesar de la existencia de numerosos estudios sobre los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales, no existe información con cepas regionales de *Salmonella* spp. Por último la mayoría de los desinfectantes utilizados con mayor frecuencia en las granjas avícolas, ensayados en las concentraciones recomendadas por los fabricantes, son eficaces para inhibir a las cepas de los serovares Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum. Los procesos de limpieza y desinfección en las granjas avícolas son de extrema importancia ya que tienen el objetivo de reducir a *Salmonella* spp. y así la probabilidad de desarrollar patologías. Por lo tanto, se deben usar productos desinfectantes con comprobada eficacia contra este patógeno.

Debido a la capacidad que posee *Salmonella* spp. para formar biopelículas, es importante determinar si las cepas aisladas de las granjas poseen esta capacidad. Es

conocido que *Salmonella* spp. en estado de biopelícula muestran una mayor supervivencia frente al tratamiento con antimicrobianos y pueden ser reservorios potenciales de este patógeno tanto en las granjas como en las plantas de procesamiento de alimentos. En este trabajo de tesis se comprobó que un elevado porcentaje de las cepas de SE y ST producen biopelículas. Sin embargo, dicho porcentaje es bajo para las cepas de SG. A su vez se demostró que las cepas productoras de biopelículas son más resistentes a algunos de los desinfectantes que las cepas no productoras de esta sustancia. Debido a las preocupaciones sobre la resistencia a los antimicrobianos y el creciente interés en estrategias de control más sostenibles, la búsqueda de alternativas al uso de antibióticos convencionales es un campo de investigación de gran relevancia. Este trabajo exploró el potencial de las bacterias ácido lácticas como agentes de biocontrol para el manejo de *Salmonella* spp. en aves de corral. Se evaluó la eficacia de las bacterias ácido lácticas para determinar su capacidad de controlar la colonización de *Salmonella* spp. en el ambiente de las aves, encontrando que *L. kefir* CIDCA 8321, en ensayos de coincubación y preincubación, disminuyen la formación de biofilm de SE y ST, mientras que el *L. plantarum* CIDCA 83114, en los mismos ensayos disminuyen la formación de biofilm de SE. A su vez, el sobrenadante de *L. plantarum* CIDCA 83114 presenta sustancias bioactivas capaces de inhibir la formación de biofilm de SE.

Los resultados de este trabajo de tesis revelan la presencia significativa de *Salmonella enterica* en *Gallus gallus* en la región estudiada, destacando la necesidad de estrategias integrales para su control. La identificación de las serovariedades predominantes y su perfil de sensibilidad a antimicrobianos proporcionan información muy relevante para la toma de decisiones en la prevención y el tratamiento de la salmonelosis. La investigación sobre la formación de biopelículas por *Salmonella enterica* y el desarrollo de estrategias para su eliminación abre nuevas perspectivas para el control de esta bacteria en el ambiente avícola. La combinación de buenas prácticas de manejo, el uso de antimicrobianos de forma responsable y la implementación de estrategias alternativas como el uso de bacterias ácido lácticas o aceites esenciales, son fundamentales para minimizar el riesgo de infección por *Salmonella enterica* y garantizar la seguridad alimentaria. Las investigaciones deben continuar explorando nuevas estrategias de biocontrol para combatir la *Salmonella enterica* y avanzar hacia una producción avícola más sostenible y segura.

PROYECCIONES

-
- ✓ Estudiar los mecanismos genéticos de resistencia a los antibióticos y desinfectantes por parte de las cepas de SE, ST y SG investigadas.
 - ✓ Estudiar el efecto de la combinación de productos desinfectantes sobre el crecimiento de las cepas de SE, ST y SG a fin de disminuir la dosis de los mismos.
 - ✓ Extender el estudio de los antimicrobianos sobre cepas de *Salmonella* spp. pertenecientes a serovares no estudiados como *S. ser. Infantis*, importante en otros países de América Latina y en Europa.
 - ✓ Profundizar las investigaciones con los aceites esenciales de orégano y espartillo para el control de *Salmonella* spp., estudiando la concentración inhibitoria mínima, su efecto sobre la producción de biopelículas y hasta la posible realización de estudios *in vivo* en aves.

ANEXOS

ANEXO 1: ENCUESTA REALIZADA EN GRANJAS DE POLLOS PARRILLEROS**Estudio de granjas de parrilleros**

CÓDIGO: _ _ _ _

IDENTIFICACIÓN DE LA GRANJA

Fecha de muestreo: _ _ _ / _ _ _ / _ _ _

Dueño:

Empresa integrada:

Dirección:

Tel:

C. electrónico:

Localidad/ Dpto:

Provincia:

Puesto persona que contesta la encuesta:

Nº de habilitación:

Profesional Responsable:

Número de galpones:

Identificación de los galpones (Nº, nombre etc.):

Capacidad Instalada:

¿Qué antibióticos utiliza?

¿Qué producto químico utiliza para desinfectar?

Estudio de granjas de parrilleros**CÓDIGO:** _ _ _ _**1. Bioseguridad**

- a. Cerco Perimetral completo y puerta de entrada No ☐ Si ☐
- b. Cumple distancias de separación con granjas vecinas (1000 m) No ☐ Si ☐
- c. ¿Posee equipo de desinfección de vehículos, equipos, jaulas e implementos? No ☐ Si ☐
- ¿Funciona? No ☐ Si ☐
- d. Posee equipamiento para el ingreso de personas (cambio de ropa y calzado; botas de plástico, overol) No ☐ Si ☐
- e. Existencia de otras especies en el predio No ☐ Si ☐
- ¿Qué especies?
- f. ¿Cuál es la distancia con un criadero de cerdos?

g. Sistema de eliminación de cadáveresComposta ☐Incineración _____ Cerrada ☐ Abierta ☐Fosa _____ Cerrada ☐ Abierta ☐

Otro sistema (especifique):.....

h. Control de moscas No ☐ Si ☐ Producto: _____

Frecuencia de tratamiento: _____

i. Control de roedores No ☐ Si ☐ Producto: _____

Frecuencia de tratamiento: _____

j. Lleva un registro (libro foliado, manual etc.) de prácticas con fines de higiene y bioseguridad? No ☐ Si ☐

2. Antecedentes de enfermedadSalmonelosis No ☐ Si ☐ Tratamiento: _____

fecha: _____ Otras:.....

Estudio de granjas de parrilleros**CÓDIGO:** _ _ _ _**3. Abastecimiento de agua**

Tipo:

Desinfección/Antibiótico

No ☐Si ☐ Producto:

¿Realiza análisis de potabilidad de agua? No ☐ Si ☐ ¿Con que
frecuencia?.....

Observaciones:

CÓDIGO: _ _ _ _ (INV_ _ _ _)

GALPÓN:

Tamaño:.....

Línea genética:.....

Tipo y número de Comederos:

Tipo y número de Bebederos:

Medicación y fecha:.....

Cantidad de aves al inicio de crianza:.....

Fecha de inicio de crianza:

Edad de las aves:.....

Número de crianzas de la cama:.....

Vacunación contra *Salmonella*:.....

Material de la cama:.....

Cantidad de aves en el día:.....

¿Cómo elimina la cama?.....

Características del galpón: Automático / Semiautomático / Manual

Espacio que rodea al galpón desmalezado, limpio,
libre de desperdicios

No ☐ Si ☐

Lateral del galpón con tejido de malla fina u otro material

No ☐ Si ☐

Número de aves muertas al día de la encuesta (% sobre total aves):.....

.....

MUESTRAS:

1. Alimento: N° bolsas: _____

Lugar de toma de muestra:

Cant. total Kg: _____

Comederos: _____ Silo: _____

2. Calzas - Cofias N°: _____ Par / es

3. Animales muertos:

Cantidad.....

Observaciones:

Identificación de las muestras:

ANEXO 2: ENCUESTA REALIZADA EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS

Estudio de granjas de aves ponedoras comerciales

CÓDIGO: INV.....

IDENTIFICACIÓN DE LA GRANJA

Fecha de muestreo: __/__/__

Empresa:

Dirección:

Tel:

C. electrónico

Localidad/ Dpto:

Provincia:

Nº de habilitación:

Profesional Responsable:

Tipo de explotación:

Número de galpones:

Identificación de los galpones (Nº, nombre etc.):

Capacidad Instalada:

Plan de vacunación:

¿Qué antibióticos utiliza?

¿Qué desinfectantes utiliza?

Estudio de granjas de aves ponedoras comerciales**CÓDIGO: INV.....****1. Bioseguridad**

- a. Cerco Perimetral completo y puerta de entrada No ☐ Si ☐
- b. Cumple distancias de separación con granjas vecinas (1000 m) No ☐ Si ☐
- c. ¿Posee equipo de desinfección de vehículos, equipos, jaulas e implementos? No ☐ Si ☐
- ¿Funciona? No ☐ Si ☐
- d. Posee equipamiento para el ingreso de personas (cambio de ropa y calzado; botas de plástico, overol) No ☐ Si ☐
- e. Existencia de otras especies en el predio No ☐ Si ☐

f. Sistema de eliminación de cadáveresComposta ☐Incineración _____ Cerrada ☐ Abierta ☐Fosa _____ Cerrada ☐ Abierta ☐

Otro sistema (especifique)

g. Control de moscas No ☐ Si ☐ Producto: _____

Frecuencia de tratamiento: _____

h. Control de roedores No ☐ Si ☐ Producto: _____

Frecuencia de tratamiento: _____

i. Lleva un registro (libro foliado, manual etc.) de prácticas con fines de higiene y bioseguridad? No ☐ Si ☐

2. Antecedentes de enfermedadSalmonelosis No ☐ Si ☐ Tratamiento: _____Micotoxicosis No ☐ Si ☐ Tratamiento: _____

Otras:

Estudio de granjas de aves ponedoras comerciales**CÓDIGO:INV.....****3. Alimento**Origen: Elaboración propia ☐ Compra a terceros ☐Presentación: Harina ☐ Pellet ☐Desinfección No ☐ Si ☐ Producto: _____Secuestrante de micotoxinas No ☐ Si ☐ Producto: _____Acidificantes No ☐ Si ☐ Producto: _____

Composición	No	Si
Maíz	☐	☐
Sorgo	☐	☐
Harina de soja	☐	☐
Poroto de soja	☐	☐
Harina de carne	☐	☐
Harina de girasol	☐	☐
Harina de pescado	☐	☐
Harina de pluma	☐	☐
Otros	☐	☐
Otros	☐	☐

4. Abastecimiento de agua

Tipo:

Desinfección No ☐ Si ☐ Producto: _____¿Realiza análisis de potabilidad de agua? No ☐ Si ☐ ¿Con que frecuencia?**5. Huevos**Destino Industrialización ☐ Consumo ☐**Tipo de Maple**Plástico ☐ ¿Reutilización? No ☐ Si ☐Cartón ☐ ¿Reutilización? No ☐ Si ☐

Otros (especifique) _____

Lavado y desinfección: Maple No ☐ Si ☐ Producto: _____Huevo No ☐ Si ☐ Producto: _____

Observaciones: _____

CÓDIGO: INV.....**GALPÓN:**

Tamaño:

Línea genética:

Cantidad de aves:

Nº de aves por jaula:

Edad de las aves:

% de postura:

Medicación:

Vacunas:

Niveles de jaulas superpuestas:

Nº de tolvas:

Número de filas por galpón:

Espacio que rodea al galpón desmalezado, limpio, libre de desperdicios

No ☐Si ☐

Lateral del galpón con tejido de malla fina u otro material

No ☐Si ☐

Cinta transportadora de guano

No ☐Si ☐

Muestras

1. Alimento N° bolsas: _____ Lugar de toma de muestra: Tolva : Silo:

2. Excretas N° bolsas: _____

3. Huevos N° maples: N° total de huevos:

4. Hisopados cloacales:

5. N° Aves muertas:

Observaciones:.....
.....
.....
.....
.....

REFERENCIAS

-
- Abd El-Hack, M.E., El-Saadony, M.T. & Shafi, M.E. (2020). Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 104, 1835-1850. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.13454>
 - Abdellah, C., Fouzia, R.F., Abdelkader, C., Rachida, S.B. & Mouloud, Z. (2009). Prevalence and anti-microbial susceptibility of *Salmonella* isolates from chicken carcasses and giblets in Meknes, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 215-219.
 - Abdou, A.M., Kim, M. & Sato, K. (2015). Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin. INTECH. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2004.02294.x/pdf>
 - Abdul Qadir, M., Shahzadi, S.K., Bashir, A., Munir, A. & Shahzad, S. (2017). Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. *Int. J Anal. Chem.*, 2017, 3475738. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2017/3475738>
 - Abid, R., Waseem, H., Ali, J., Ghazanfar, S., Muhammad, Ali, G., Elsbali, A.M. & Alharethi, S.H. (2022). Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. *J Fungi (Basel)*, 8(5), 444.
 - Abraham, E. (1987). Cephalosporins. *Drugs*, 4(2), 1-4.
 - Abriata, G., Poyard, E., Roques, L., Hamse, G. & Codebó, M.O. (2006). Boletín Epidemiológico Periódico. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Buenos Aires, Argentina.
 - Abu-Ruwaida, A.S., Sawaya, M.N., Dashti, B.H., Murad, M. & Al-Othman, H.A. (1994). Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *Journal of Food Protection*, 57, 887-892.
 - Agarwal, R.K., Singh, S., Bhilegaonkar, K.N. & Singh, V.P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*, 18(4), 1493-1498.
 - Agencia Santafesina de Inocuidad Alimentaria (2024). Hierbas aromáticas Romero. Comé de Estación. <https://www.assal.gov.ar/comedeestacion/romero.html#:~:text=Es%20un%20arbusto%20perenne%20que,el%20suelo%20como%20en%20maceta>
 - Agrofy News. (2023). Ranking de Consumo de Huevo en Argentina. <https://news.agrofy.com.ar/noticia/203216/ranking-consumo-huevo-argentina-esta-cuarta-nivel-mundial> .
 - Agron, P.G., Walker, R.L., Kinde, H. Sawyer, S.J., Hayes, D.C., Wollard J. & Andersen, G.L. (2001). Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4984-4991.
 - Ahmad, I., Rouf, S.F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Le Guyon, S. & Römling, U.
-

(2016). BcsZ inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial cell factories*, 15(1), 177.

- Ahmed, S., Gogal, R. & Walsh, J. (1994). A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [3H] thymidine incorporation assays. *Journal of Immunology Method*, 170, 211-224.
- Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Chihib N. & Drider D. (2014) Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 116-124.
- Akinola, S.A., Tshimpamba, M.E., Mwanza, M. & Ateba, C.N. (2020). Biofilm Production Potential of *Salmonella* Serovars Isolated from Chickens in North West Province, South Africa. *Pol J Microbiol.*, 69(4), 427-439.
- Alanis, A.J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archiv. Med. Res.*, 36, 697-705.
- Alcaine, S.D., Warnick, L.D. & Wiedmann, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J. Food Protect.*, 70, 780-790.
- Aleksandrowicz, A., Carolak, E., Dutkiewicz, A., Błachut, A., Waszczuk, W., Grzymajło, K. (2023). Better together-*Salmonella* biofilm-associated antibiotic resistance. *Gut. Microbes.*, 15(1), 2229937.
- Alenazy, R. (2022). Antibiotic resistance in *Salmonella*: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. *Journal of King Saud University - Science*. 34, 102275.
- Ali, A., Chua, B.L. & Chow, Y.H. (2019). An insight into the extraction and fractionation technologies of the essential oils and bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis* L.: Past, present and future. *Trends in Analytical Chemistry*, 188, 338-351.
- AliAbadi, F.S. & Lees, P. (2000). Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14, 307-313.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. & Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4168-4170.
- Al-Mathkhury, H.J. (2012). Inhibitory effect of lactobacilli filtrate on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Iraqi Academic Scientific Journal*, 11(2), 168-179.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., & Alonso-Calleja, C. (2009). Adaptation

and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. The Journal of Microbiology. 47, 142–146.

- Andrews, W.H., Wang, H., Jacobson, A., Ge, B., Zhang G., & Hammack T. (2023). *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual. <https://www.fda.gov/media/166699/download?attachment>
- ANLIS Dr.C.G.Malbrán, & WHONET- Argentina. (2021). *Protocolo de Trabajo de la Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET Argentina*. ANLIS Dr.C.G.Malbrán. <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/2374>
- Apata, D.F. (2009). Antibiotic resistance in poultry. Int. J. Poult. Sci., 8, 404-408.
- Apel, D., White, A.P., Grassl, G.A., Finlay, B.B., & Surette, M.G. (2009). Long-term survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals an infectious state that is underrepresented on laboratory media containing bile salts. Applied and Environmental Microbiology, 75, 4923-4925.
- Ardoino, S.M., Toso, R.E., Toribio, M.S., Álvarez, H.L., Mariani, E.L., Cachau, P.D., Mancilla, M.V., Oriani, D.S. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. Ciencia Vet., 19, 50-66.
- Arena, M.P., Capozzi, V., Spano, G. & Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. Applied microbiology and biotechnology, 101(7), 2641-2657.
- Aya Castañeda, M.D.R.A., Sarnacki, S.H., Llana, M.N., Guerra, A.G.L., Giacomodonato, M.N. & Cerquetti, M.C. (2015). Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. International journal of food microbiology, 193, 15-22.
- Azeredo, J., Azevedo, N., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. Critical Reviews in Microbiology, 43, 313-351.
- Bada-Alamedji, R., Fofana, A., Seydi, M. & Akakpo, A.J. (2006). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). Braz. J. Microbiol., 37(4), 510-515. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400020>
- Bandoni, A.L., Retta, D., Di Leo Lira, P.M. & Baren, C.M. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(5), 317-322.

-
- Banerjee, G. & Ray, A.K. (2016). The talking language in some major Gram-negative bacteria. *Archives of Microbiology*, 198, 489-499.
 - Banerjee, G. & Ray, A.K. (2016). The talking language in some major Gram-negative bacteria. *Archives of microbiology*, 198, 489-499.
 - Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R.S., Lo Fo Wong, D.M.A. & Aarestrup, F.M. (2004). *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 131-136.
 - Barnass, S., Franklin, J. & Tabaqchali, S. (1990). The successful treatment of multiresistant nonenteric salmonellosis with seven day oral ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother*, 25, 299-300.
 - Barrons, R. & Tassone, D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical therapeutics*, 30(3), 453-468.
 - Barroso, J.M. (2012). Commission Regulation (EU) No 200/2012 of 8 March 2012 concerning a Union target for the reduction of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in flocks of broilers, as provided for in Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L71, 31 36.
 - Barrow, G. & Feltham, R. (1993). *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. 3a ed. Cambridge Inglaterra. Cambridge University Press.
 - Barrow, P.A. & Freitas Neto, O.C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.*, 40, 1-13.
 - Basheer, A.I. (2018). Effect of alcoholic extract of *rosmarinus* against some type of enterobacteriaceae. *Tikrit Journal of Pure Science*, 23, 18-21.
 - Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R., Ouattara, C.A.T., Kabore, Z.I. & Traore, S.A. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochem.* 62(2), 209-212.
 - Batista, D.F.A., Freitas Neto, O.C., Barrow, P.A., Oliveira, M.T., Almeida, A.M. & Ferraudo, A.S. (2015). Identification and characterization of regions of difference between the *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum and the *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum genomes. *Infect. Genet. Evol.*, 30, 74-81.
 - Batz, M.B., Hoffmann, S. & Morris, J.G. (2012). Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J. Food Prot.* 75, 1278–1291.
-

-
- Bauer, K., Garbe, D. & Surburg, H. (2001). Common Fragrance and Flavor Materials: preparation, properties and uses. Wiley-VCH, 293.
 - Becerril, R., Nerín, C. & Gómez-Lus, R. (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to *Oregano* and *Cinnamon* essential oils. Foodborne Pathogens and Disease, 9(8), 699-705.
 - Bell, C. & Kyriakides, A. (2002). Test methods. Páginas 282-294 en *Salmonella: A practical approach to the organisms and its control of food*. Blackwell Science Ltd ed., París, Francia.
 - Bello, A. (1999). Estudios de aceites esenciales de especie Myrtaceae de la flora de Pinar del Río. Tesis de Maestría, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad del Rio, Brasil.
 - Beltrán, K.L., Déciga, M., Aguilar, H., González, M.E., Martínez, M.F., Ramírez, M.A., Rios, M.Y. & López, F.J. (2017). Synergistic antinociceptive interaction of *Syzygium aromaticum* or *Rosmarinus officinalis* coadministered with ketorolac in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy, 94, 858-864.
 - Ben-Amor, K., Heilig, H., Smidt, H., Vaughan, E., Abee, T. & de Vos, W. (2005). Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cells or using 16S rRNA gene analysis. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4679-4689.
 - Benelli, L. & Oliveira, W.P. (2019). Fluidized bed coating of inert cores with a lipid-based system loaded with a polyphenol-rich *Rosmarinus officinalis* extract. Food and Bioproducts Processing, 114, 216-226.
 - Berchieri Jr., A., de Oliveira, G.H. Soeiro Pinheiro, L.A. & Barrow. P.A. (2000). Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. Braz. J. Microbiol., 31, 50-52.
 - Berchieri, A., Iba, Jr.A.M. & Barrow, P.A. (1995). Examination by ELISA of sera obtained from chicken breeder and layer flocks showing evidence of fowl typhoid or Pullorum disease. Avian Pathology, 24, 411-420.
 - Betelgeux, 2020. TBF® 300 y TBF® 300S. <https://www.betelgeux.es/images/files/Catalogos/C-PR-BIOFILMS-2020-ES.pdf>
 - Bilska, A., Kobus, J., Kmiecik, D., Danyluk, B., Kowalski, R., Szymanowska, D., Gramza, A. & Szczepaniak, O. (2019). Cholinesterase inhibitory activity, antioxidative potential and microbial stability of innovative liver pâté fortified with rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*). Electronic Journal of Biotechnology, 40, 22-29.
 - Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M. & Hoiby, N. (2013). Applying insights
-

from biofilm biology to drug development—Can a new approach be developed? Nat. Rev. Drug. Discov., 12, 791-808.

- Bogaard, A.E., Willems, R., London, N., Top, J. & Stobberingh, E.E. (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, farmers and poultry slaughterers. J. Of Antimicrob. Chemother., 49, 497-505.
- Bohn, L., Meyer, A.S. & Rasmussen, S.K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. Journal of Zhejiang University Science, B 9, 165-191.
- Boles, B.R., Thoendel, M. & Singh, P.K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. Molecular microbiology, 57(5), 1210-1223.
- Boletín Integrado de Vigilancia. Dirección Nacional De Epidemiología Y Análisis De La Situación De Salud Ministerio de Salud de la Nación. (2018). Boletín N° 409– SE 18. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv-409-se18.pdf>
- Bonner, D.P. & Sykes, R.B. (1984). Structure activity relationships among the monobactams. J. Antimicrob. Chemother., 14, 313-327.
- Boonprasert, N., Nuanualsuwan, S., Pulsrikarn, C., Pornaem, S. & Chokesajjawatee, N. (2014). Sources and Disseminations of *Salmonella* spp. in an Integrated Broiler Meat Production. Thai Journal of Veterinary Medicine. 44. 117-124.
- Boot, H.J. & Pouwels, P.H. (1996). Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. Molecular microbiology, 21(6), 1117-1123.
- Borges, R.S., Sánchez, B.L., Matias, A.C., Keita, H. & Tavares, J.C. (2018). Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. Journal of Ethnopharmacology, 229, 29-45.
- Botero Hoyos, L.A. (2007). Salmonelosis y su control. Engormix <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/salmonellosis-controlt1483/165-p0.htm>.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Journal of Immunology Method, 37, 77-86.
- Boundless (2016). Antibiotic Classifications. Boundless microbiology. <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundlessmicrobiology-textbook/antimicrobial-drugs-13/overview-ofantimicrobial-therapy-153/antibiotic-classifications-775-4905/>.
- Bouzidi, N., Aoun, L., Zeghdoudi, M., Bensouilah, M., Elgroud, R., Oucief, I., Granier, S.A., Brisabois, A., Desquilbet, L. & Millemann, Y. (2012). *Salmonella* contamination of

laying-hen flocks in two regions of Algeria. Food Res. Int. 45, 897-904.

- Breeuwer, P., Drocourt, J., Bunschoten, N., Zwietering, M., Rombouts, F., Abee, T. (1995) Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1614-1619.
- Bremer, P.J., Fillery, S. & McQuillan, A.J. (2006). Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International Journal of Food Microbiology, 106, 254-262.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol., 38, 2465-2467.
- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E. & Fontaine-Aupart, M.P. (2008). Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. Appl. Environ. Microbiol., 74(7), 2135-2143.
- Bridier A., Dubois-Brissonnet F., Boubetra A., Thomas V. & Briandet R. (2011). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. Journal of Microbiological Methods, 82, 64-70.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. Biofouling, 27(9), 1017-1032.
- Bryan, F.L. & Doyle, M.P. (1995). Risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. Journal of Food Protection, 58, 326-344.
- Bryers, J. (1987). Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. Biotechnology Progress., 3, 57-68.
- Bueno, D.J., Soria, M.A., Guillermo, G., Procura, F. & Rodríguez, F.I. (2016). *Salmonella* sp. en cama de aves; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 19-35.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.
- Burt, S.A. & Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett Applied Microbiol., 36: 162-167.
- Burt, S.A. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food, PhD thesis, Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health, Utrecht University, Utrecht, Netherlands.
- Busse, M. (1995). Media for *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol., 26, 117-131.

-
- Cabrera, R., Ruiz, J., Ramírez, M., Bravo, L., Fernández, A., Aladueña, A., Echeita, A., Gascón, J., Alonso, P. & Vila, J. (2006). Dissemination of *Salmonella enterica* serotype Agona and multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Thyphimurium in Cuba. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74, 1049-1053.
 - Cacciabue, M., Gallucci, N., Cordero, G.P., Kolb, N., Demo, M. & Sabini, L. (2005). *Elionurus muticus* from north of Argentina: evaluation of the antibacterial activity of three essential oil chemotypes. *Biocell* 29, 223-226.
 - Cadieux, P., Burton, J., Devillard, E. & Reid, G. (2009). *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of physiology and pharmacology*, 60, 13-8.
 - Caffer, M.I. & Pichel, M. (2006). Evolución de la salmonelosis y brotes hospitalarios por *Salmonella* spp. en los últimos 15 años. Páginas 209-215 en: Temas de zoonosis III. R.A. Cacchione, R. Durlach, O. P. Larghi y P. Martino eds. Asoc Arg Zoon, Buenos Aires, Argentina
 - Caffer, M.I. & Pichel, M. (2006). Evolución de la salmonelosis y brotes hospitalarios por *Salmonella* spp. en los últimos 15 años. Páginas 209-215 en: Temas de zoonosis III. R. A. Cacchione, R. Durlach, O. P. Larghi y P. Martino eds. Asoc Arg Zoon, Buenos Aires, Argentina.
 - Caffer, M.I. & Terragno, R. (2001). Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud Subsecretaría de Investigación y Tecnología. Buenos Aires, Argentina
 - Caffer, M.I. & Terragno, R. (2008). Familia Enterobacteriaceae. En: Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina. p. 1-5
 - Caffer, M.I., Pichel, M. & Viñas, M.R. (2014). Género *Salmonella*. En Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina. p. 15-26.
 - Camargo, T.M., Stipp, R.N., Alves, L.A., Harth-Chu, E.N., Höfling, J.F. & Mattos-Graner, R.O. (2018). Novel two-component system of *Streptococcus sanguinis* affecting functions associated with viability in saliva and biofilm formation. *Infection and immunity*, 86(4), e00942-17.
 - Canet, Z.E., Dottavio, A.M., Romera, B.M., Librera, J.E., Advínculo, S.A., Martines, A. & Di Masso, R.J. (2021). Estrategia de cruzamientos para el mejoramiento de pollos Camperos. Un proyecto colaborativo INTA-Universidad. BAG. *Journal of basic and applied genetics.*, 32(2), 59-70.
 - Cantón R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistencia: una oportunidad para que las
-

bacterias y los genes de resistencia. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 11, 477-485.

- Cantón, R., Coque, T.M., Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16, 315-325.
- Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E., Cisse, M. & Salvat, G. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp *enterica* infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 63, 151-161.
- Carr, L., Rigakos, C., Carpenter, G., Berney, G. & Joseph, S. (1999). An assessment of livehaul poultry transport container decontamination. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 19, 753-759.
- Carrillo Terán, W.. (2013). Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenidad. Actualización en Nutrición. 14. [https://www.researchgate.net/publication/323105738 Lisozima Actividad antibacteriana y alergenidad](https://www.researchgate.net/publication/323105738_Lisozima_Actividad_antibacteriana_y_alergenidad)
- Carrique-Mas, J.J. & Davies, R.H. (2008). Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics), 27, 665-677.
- Carrique-Mas, J.J., Barnes, S., McLaren, I. & Davies, R. (2009). Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D). *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1976-1983.
- Carson, F., Mee, B. & Riley, T. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Cassidy, P.J., Albers-Schonberg, G., Goegelman, R.T., Miller, T., Arison B., Stapley, E.O. & Birnbaum, J. (1981). Epithienamycins. II. Isolation and structure assignment. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 34, 637-648.
- Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J. & Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *VITAE*, 17(2), 149-154.
- Castelijns, G. (2013). *Salmonella* biofilms. Thesis for the degree of doctor. Wageningen,
- Castro, L.O. & Ramos R.L.D. (2003). Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus*, capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palmarosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides* Nash, vetiver. *Fepagro*, 11. 1-31.

-
- Castro-Vargas, R.E., Herrera-Sánchez, M.P, Rodríguez-Hernández, R. & Rondón-Barragán, I.S. (2020). Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet. World.*,13(10), 2070-2084. DOI: doi: 10.14202/vetworld.2020.2070-2084.
 - CDC (Center for disease Control and Prevention) (2012). Food and Drug Administration and National Institutes of Health. A public health action plan to combat antimicrobial resistance. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/publichealth-action-plan-combat-antimicrobial-resistance.pdf>
 - CDC (Center for disease Control and Prevention). (2023). Food and Drug Administration and National Institutes of Health. *Salmonella* . <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
 - CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2013). An atlas of *Salmonella* in the United States, 1968–2011: Laboratory-based enteric disease surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/salmonella-atlas-508c.pdf>
 - Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (1997). *Salmonella* serotype Montevideo infections associated with chicks— Idaho, Washington, and Oregon, spring 1995 and 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 46, 237–239. <https://ftp.cdc.gov/pub/publications/mmwr/wk/mm4611.pdf>
 - Cesur, A., Ulutaş, S.Ö. & Soyer, Y. (2019). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* from poultry samples. *Turk. J. Vet Anim. Sci.* 43, 408-422.
 - Chacana, P. & Terzolo, H. (2003). Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. *Revista de Medicina Veterinaria*, 84, 14-20.
 - Chagonda, I.S., Makanda, C. & Chalchat, J.C. (2000). The essential oils of wild and cultivated *cymbopogon validus* (stapf) stapf ex burtt day and *elionurus muticus* (spreng.) kunth from Zimbabwe. *Flavour Frag. J.* 15, 100-104.
 - Chambers, H.F. (2006). Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents, pp. 1173-1202. In L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker (ed.), *The pharmacological basis of therapeutics*. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York.
 - Chapman, C., Gibson, G. & Rowland, I. (2014). Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract. *Anaerobe*, 27, 71-76.
 - Chen, H., Anantheswaran, R.C. & Knabel, S.J. (2001). Optimization of iron supplementation for enhanced detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs. *Journal of Food Protection*, 64, 1279-1285.
-

-
- Chen, H., Fraser, A. D. & Yamazaki, H. (1993). Evaluation of the toxicity of *Salmonella* select media for shortening the enrichment period. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 151–159.
 - Chen, M.H., Hwang, W.Z., Wang, S.W., Shih, Y.C. & Tsen, H.Y. (2011). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant *Salmonella* enterica serovar Schwarzengrund isolates collected in six years (2000–2005) from retail chicken meat in Taiwan. *Food Microbiology*, 28, 399-405.
 - Chiu, C.H., Wu, T.L., Su, L.H., Chu, C., Chia, J.H., Kuo, A.J. & Lin, T.Y. (2002). The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *The New England Journal of Medicine*, 346, 413-419.
 - Chmielewski, R. & Frank, J. (2006). A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on rubber. *Food Science and Technology*, 39, 11-19.
 - Chmielewski, R.A.N. & Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
 - Choquet-Kastylevsky, G., Vial, T., Descotes, J., (2002). Allergic adverse reactions to sulfonamides. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2 (1), 1625.
 - Christensen, G., Simpson, W., Yonger, J., Baddor, L., Barrett, F., Melton, D. & Beachey, E. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 996-1006.
 - Ciandrini, E., Campana, R. & Baffone, W. (2017). Live and heat-killed *Lactobacillus* spp. interfere with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis* during biofilm development on titanium surface. *Archives of oral biology*, 78, 48-57.
 - Cloeckert, A. & Schwarz, S. (2001). Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella* enterica Typhimurium DT 104. *Vet. Res.* 32, 301-310.
 - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2022a). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. VET01S-Ed5* (5th ed.).
 - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Document M100-S17*. Wayne, PA: CLSI.
 - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2015). *M7-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*.
-

-
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. United States: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
 - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2017). M100. 27th Edition, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
 - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2022b). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 32 Edition CLSI supplement M100* (32nd ed.).
 - Código Alimentario Argentino. Alimentos cárneos y afines. (2023). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_vi_carneos_act_2023_5.pdf.
 - Cogan, T.A., Domingue, G.H., Lappin-Scott, M., Benson, C.E., Woodward, M.J. & Humphrey, T.J. (2001). Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 131-141.
 - Colpo J. F., Jahnke S. M. & Füller T. (2014). Potencial inseticida de óleos de origen vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) *Revista Bras. Pl. Med.* 16, 182-188.
 - Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. & Palma, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 130-135.
 - Costerton, J.W., Geesey, G.G. & Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.*, 238, 86-95.
 - Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322.
 - Coughlan, L.M., Cotter, P.D., Hill, C. & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 18(7), 1641.
 - Coughlan, L.M., Cotter, P.D., Hill, C. & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1641.
 - Cox, N.A., Davies, B.H. Kendall, J.H. Watts A.B. & Colmer A. R.. 1972. A comparison of various enrichment broths and plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry feces and poultry foods products. *Poult. Sci.* 51, 1312-1316.
 - D'antuono, L.F., Galletti, G.C. & Bocchini, P. (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a north mediterranean area
-

(Liguria region, north Italy). *Ann. Bot.*, 86, 471-478.

- D'Aoust, J.Y. & Maishment, C. (1979). Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. *J. Food Prot.*, 42, 153-157.
- D'Aoust, J. Y. (1989). *Salmonella*. In M. P. Doyle (Ed.), *Foodborne bacterial pathogens* (pp. 321–445). New York: Marcel Dekker Inc.
- D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. & Warburton, D.W. (1992). A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 41-50.
- Daquigan, N., Grim, C. J., White, J.R., Hanes, D.E. & Jarvis, K.G. (2016). Early recovery of *Salmonella* from food using a 6-hour non-selective pre-enrichment and reformulation of tetrathionate broth. *Front. Microbiol.*, 7, 2103.
- Das, J., Mishra, D., Ray, P., Tripathy, P., Beuria, T., Singh, N. & Suar, M. (2013). In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut. Pathogens*, 5, 1-11.
- Davies, R. & Breslin, M. (2003). Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Veterinary Record.*, 152, 283-287.
- Davila Moran, R. & Cruz, V.. (2022). Influencia de *Salmonella* Pullorum y *S. Gallinarum* en la producción avícola y la salud pública. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.*, 62., 623-630.
- Davis, B.D., Chen, L.L., Tai, P.C., (1986). Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (16), 6164-6168.
- Dawson, B. & Trapp, R.G. (2005). *Basic and Clinical Biostatistics*. McGraw-Hill Companies Inc. New York.
- De los Santos Villamil, A.A., Hernández Anguiano, A.M., Eslava Campos, C.A., Landa Salgado, P., Mora Aguilera, G. & Bernard Luchansky, J. (2012). Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en cepas de *Salmonella* aisladas de nopal, agua y suelo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1063-1074.
- De Oliveira, D., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Silva, M., Araújo Júnior, J., Silva, N. & Rall, V. (2014). Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11, 478-483.
- de Quadros, C.L., Manto, L., Mistura, E., Webber, B., Ritterbusch, G.A., Borges, K.A., Furina Rodrigues, L.B. & Dos Santos, L.R. (2020). Antimicrobial and Disinfectant

Susceptibility of *Salmonella* serotypes Isolated from Swine Slaughterhouses. *Curr. Microbiol.*, **77**, 1035–1042 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01904-9>

- De Rezende, C., Anriany, Y., Carr, L., Joseph, S. & Weiner, R. (2005). Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and environmental microbiology*, **71**, 7345-7351.
- De Sousa, E., Werther, K., Berchieri Junior, A., Almeida, A.M., Ardisson, F.A., Silva, A.C., Candioto, C.G. & Fernandes, S.A. (2013). Experimental Infection of One-Day-Old Chicks with *Salmonella* Serotypes Previously Isolated from Poultry Facilities, Wild Birds, and Swine. *Braz. J. Poult. Sci.*, **15** (4), 301-305.
- Denham, S.S. (2012). *Elionurus*. En: Zuloaga, F.O., Rúgolo Z.E. & Anton, A.M. (Eds.). *Flora Argentina. Plantas Vasculares de la República Argentina. Monocotiledoneae: Poaceae: Aristidoideae-Pharoideae.*, **3**, 514-516.
- Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service. United States (2017). National Poultry Improvement Plan Program Standards. <https://www.poultryimprovement.org/documents/ProgramStandardsJanuary2017.pdf>
- Dewick, P.M (1997). Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & sons., Chap. 5, 152-213.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2014). InfoStatversión Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz, de Rada Vidal (2001). *Diseño y elaboración de cuestionarios para la investigación comercial*. Pozuelo de Alarcón, España. Esic editorial.
- Díaz-Sánchez, S., D'Souza, D., Biswas, D. & Hanning, I. (2015). Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poultry Science*, **94**(6), 1419-1430.
- Díez-García, M., Capita, R. & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, **31**, 173-180.
- Dominguez, C., Gomenz, I. & Zumalacarregui, J. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, **72**, 165-168.
- Dominguez, J.E. (2016). Estudio y evaluación de la dinámica de resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas en *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* en animales de producción. Tesis. Universidad Nacional de Buenos Aires Facultad de Farmacia y Bioquímica.

-
- Donlan, R M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
 - Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-193.
 - Donlan, R.M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in microbiology*, 17(2), 66-72.
 - Donlan, R.M., Priede, J.A., Heyes, C.D., Sanii, L., Murga, R., Edmonds, P. & El-Sayed, M.A. (2004). Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumonia* biofilms insitu and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(8), 4980-4988.
 - Dookeran, M.M., Baccus-Taylor, G.S., Akingbala, J.O., Tameru, B. & Lammerding, A.M. (2012). Transmission of *Salmonella* on broiler chickens and carcasses from production to retail in Trinidad and Tobago. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research*, 1(5), 78-84.
 - Dosti, B., Guzel-seydim, Z.E.Y.N.E.P., Greene, A.K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 19-24.
 - Dottavio, A.M. & Di Masso, R.J. (2010). Mejoramiento avícola para sistemas productivos semi-intensivos que preservan el bienestar animal. *J. Basic Appl. Genet.*, 21.
 - Drauch, V., Ibesich, C., Vogl, C., Hess, M. & Hess, C. (2020). In-vitro testing of bacteriostatic and bactericidal efficacy of commercial disinfectant against *Salmonella* Infantis reveals substantial differences between products and bacterial strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 328, 08660. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108660>.
 - Dubois-Brissonnet, F., Naïtali, M., Mafu, A., Briandet, R. (2011). Induction of Fatty Acid Composition Modifications and Tolerance to Biocides in *Salmonella* Serovar Typhimurium by Plant-Derived Terpenes. *Applied Environmental Microbiology*, 77(3), 906-910.
 - Duguid, J.P., Anderson, E.S. & Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 92, 107-138.
 - Duguid, J.P., Anderson, E.S. & Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 92, 107-138.
 - Dvorak, G. (2005). Center for Food Security and Public Health, Ames, IA: Iowa State University; 2005. Disinfection. <http://www.cfsph.iastate.edu/BRM/resources/Disinfectants/Disinfection101Feb2005.pdf>
 - Dzingirai, B., Muchuweti, M., Murenje, T., Chidewe, C., Benhura, M.A.N. & Chagonda,
-

L. S. (2007). Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. *Afr. J. Biochem. Res.* 1, 137-141.

- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A. & Goudarzian, F. (2020). Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*, 521, 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>
- Edwards, P.R. & Ewing W.H. (1986). Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reaction. Páginas 47-72 en Identification of the Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Co., Inc, New York, N.Y.
- Edwards, P.R. & Fife, M.A. (1961). Lysine-iron agar in the detection of Arizona cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 9, 478-480.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. *EFSA Journal*, 720, 1-84.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2023). *Salmonella*. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/salmonella#:~:text=En%202021%2C%20la%20salmonelosis%20fue,UE%20en%20comparaci%C3%B3n%20con%202020>
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N. & Elaissari, A. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.*, 483(1-2), 220-243.
- El-Aziz, D.M.A. (2013). Detection of *Salmonella* Typhimurium in retail chicken meat and chicken giblets. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 678–681.
- Elechosa, M., Mizrahi, I., Juarez, M. & Bandoni, A. (1986). Composición del aceite esencial de un espartillo (*Elionurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze) tipo geraniol proveniente de Corrientes. *S.A.I.P.A.*, 7, 25-39.
- Elgayyar, M., Draughon, F., Golden, D.A. & Mount, J.R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protect.*, 64 (7), 1019-1024.
- Elgroud, R., Zerdoumi, F., Benazzouz, M., Bouzitouna-Bentchouala, C., Granier, S.A., Frémy, S., Brisabois, A., Dufour, B. & Millemann Y. (2008). Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria). *Zoonoses Public Health*, 56(2), 84-93.
- El-Tras, W.F., Tayel, A.A. & Samir, A. (2010). Potential zoonotic pathways of *Salmonella* Enteritidis in laying farms. *Vector Borne Zoonot. Dis.*, 10, 739-742.
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M. &

Eloutassi, N. (2019). Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and Microwave assisted hydrodistillation. The Scientific World Journal, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>

- Entis, P. 2002. Food Microbiology. The Laboratory. Páginas 25-48. Foods Processors Institute ed., Washington DC, U.S.A.
- Epe, B. (1984). Ribosomal particles: a quantitative study by fluorescence anisotropy. Binding 6- demethylchlortetracycline 70S, 50S 30S ribosomal particles: a quantitative study of fluorescence anisotropy. EMBO J. 3(1), 121126.
- Eriksson, E. & Aspan. A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Vet. Res., 3, 21.
- Errecalde, J.O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO Producción y sanidad animal. Roma. p. 26.
- Estrada-Acosta, M., Jiménez, M., Chaidez, C., León-Félix, J. & Castro-del Campo, N. (2014). Irrigation water quality and the benefits of implementing good agricultural practices during tomato (*Lycopersicum esculentum*) production. Environmental Monitoring and Assessment, 186(7), 4323-4330.
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics : Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res., 4, 90-101.
- Evangelista-Martínez, Z., Reyes-Vázquez, N. & Rodríguez-Buenfil, I. (2018). Antimicrobial evaluation of plant essential oils against pathogenic microorganisms: In vitro study of oregano oil combined with conventional food preservatives. Acta Universitaria, 28(4), 10-18.
- Ewart, S.L. (2001). Desinfectantes y control de la contaminación ambiental. En: Smith BL. editor. Medicina interna de animales grandes: enfermedades de caballos, ganado vacuno, ovino y caprino. 3.^a edición. St. Louis: Mosby. pp. 1371- 1380
- Fagbamila, I.O., Barco, L., Mancin, M., Kwaga, J., Ngulukun, S.S., Zavagnin, P., Lettini, A.A., Lorenzetto, M., Abdu, P.A., Kabir, J., Umoh, J., Ricci, A. & Muhammad, M. (2017). *Salmonella* serovars and their distribution in Nigerian commercial chicken layer farms. PLoS One, 9, 12(3), e0173097. doi: 10.1371/journal.pone.0173097
- FAO (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Departamento de Agricultura, Estudio 162-Roma
- FAO. (2013). Revisión del Desarrollo Avícola. <https://www.fao.org/3/i3531s/i3531s.pdf>.
- FAO/OMS/OIE. (2010). Reunión conjunta FAO/OMS/OIE de expertos sobre los antimicrobianos de importancia crítica. Informe de la reunión de expertos Sede de la FAO,

Roma (Italia) del 26 al 30 de noviembre de 2007.
<https://www.fao.org/3/i0204s/i0204s00.pdf>

- Field, D., O' Connor, R., Cotter, P., Ross, R. & Hill, C. (2016). In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in Combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 508-519.
- Filadoro, A. (2015). Ministerio de Economía y Finanzas públicas. Complejo Avícola-Carne y Huevo. 1-46.
- Foley, S.L., Lynne, A.M. & Nayak, R. (2008). *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, 86, 149-162.
- Font, E. (2001). Antisépticos y desinfectantes. *Offarm*, 20(2), 55-64.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. & Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei* rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152(2), 167-173.
- Freitas, A.R., Coque, T.M., Novais, C., Hammerum, A.M., Lester, C.H., Zervos, M.J., Donabedian, S., Jensen, L.B., Francia, M.V., Baquero, F., Peixe, L. (2011). Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J. Clin. Microbiol.*, 49, 925-931.
- Fujihara, M., Tabuchi, H. & Uegaki, K. (2016). Growth kinetics of *Salmonella enterica* in Hajna tetrathionate broth, Rappaport broth and modified semisolid Rappaport agar. *J. Vet. Med. Sci.*, 78, 435-438.
- Fukushima, M., Kakinuma, K. & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol.* 40(8), 2779-2785.
- Füller, T.N., Bertrand, C., Simon, A., De Barros, I.B.I. & Barbosa-Neto, J. F. (2014). *Elionurus muticus* as an alternative source of citral from Pampa biome, Brazil. *J. Oleo Sci.* 63, 1109- 1116.
- Füller, T.N., Tessele, C. De Barros, I.B.I. & Barbosa-Neto, J.F. (2010). Phenotypical, phytochemical and molecular characterization of capim carona [*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze] populations. *Revista Bras. Plantas Med.* 12, 261-268.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 15-28.
- Galas, M. & Pasterán, F. (2008). Manual de procedimientos. Sensibilidad a los

antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia WHO-Global Salm Surv para América del Sur. p. 1-44.

- Gálvez-Irqui, A.C., Plascencia-Jatomea, M. & Bautista-Baños, S. (2020). Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 38, 3. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-6>
- Gama, N.M.S.Q., Berchieri Jr. A., & Fernandes S.A. (2003). Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5, 1-7.
- García, B., Latasa, C., Solano, C., Portillo, F.G.D., Gamazo, C., Lasa, I. (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular microbiology*, 54(1), 264-277.
- García, C., Soriano, J.M., Benítez, V. & Catalá-Gregori, P. (2011). Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poult. Sci.*, 90, 1581-1585.
- Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pérez, P.F., Semorile, L. & De Antoni, G.L. (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of Slayer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 222-230.
- Gast, R. K. (2013). Paratyphoid infections. Pages 693–713, 718–733 in *Diseases of Poultry*, 13th ed. D. E. Swayne, ed., Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Gast, R.K. & Porter, Jr. R.E. (2020). *Salmonella* infections. Páginas 719-753 In *Diseases of Poultry*, 14ª edición. D. E. Swayne, ed. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- Gast, R.K. (2008). Paratyphoid infections. Pages 636–655 in *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, ed. Blackwell Publ., Ames, IA
- Gast, R.K. 2011. Controlling egg contamination with *Salmonella* Enteritidis by understanding its pathobiology. XXII Latin American Poultry Congress. https://en.engormix.com/poultry-industry/bacterial-diseases-poultry/controlling-egg-contamination-salmonella_a34901/
- Gast, R.K., Guraya, R. & Guard, J. (2013). *Salmonella* Enteritidis deposition in eggs after experimental infection of laying hens with different oral doses. *Journal of Food Protection*, 76, 108-113.
- Gelinski, J.M.L.N., Martin, G. Destro, M.T., Landgraf, M. & de Melo Franco, B.D.G. (2002). Rapid detection of *Salmonella* in foods using a combination of SPRINT TM, MSRV

TM and *Salmonella* Latex TestTM. Rev. Bras. Cienc. Farm. 38, 315-322.

- Gernat, A. (2004). Poultry farm biosecurity. North Carolina State University Dept. of Poultry Science, North Carolina Cooperative Extension Service.
- Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M. & Boskou, D. (1998). Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to methanolic extracts of two Oregano species. J. Agric. Food Chem., 46, 4185-4192.
- Giaouris, E. (2020). Application of lactic acid bacteria and their metabolites against foodborne pathogenic bacterial biofilms. 10.1016/B978-0-12-819497-3.00009-X.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N. & Nychas, G. (2005). Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. Journal of Food Protection, 68, 2149-2154.
- Gibson, D., White, A., Snyder, S., Martin, S., Heiss, C. & Azadi, P. (2006). *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. Journal of Bacteriology, 188, 7722-7730.
- Göksel, Ş., Akçelik, N. Özdemir, C. & Akcelik, M. (2022). The Effects of Lactic Acid Bacteria on *Salmonella* Biofilms. *Microbiology*, 91(3), 278-285.
- Golowczyc, M.A., Gugliada, M.J., Hollmann, A., Delfederico, L, Garrote, G.L., Abraham A.G., Semorile, G.L. & De Antoni, G.L. (2008). "Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic". Journal of Dairy
- Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Abraham, A.G. & De Antoni, G.L. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Int J Food Microbiol., 118(3), 264-273.
- Gomes, C., Martínez-puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruizroldán, L. & Pons, M.J, (2016). Critical Reviews in Microbiology Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae : Focus on azithromycin Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae : Focus on azithromycin. Reviews in Microbiology, 43, 1, 1-30. DOI: [10.3109/1040841X.2015.1136261](https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261)
- Gómez, N., Ramiro, J., Quecan, B. & de Melo Franco, B. (2016). Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 Biofilms Formation. Frontiers in Microbiology, 7, 863.
- Gómez-Suárez, C., Busscher, H. & van der Mei, H. (2001). Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. Applied and

Environmental Microbiology, 67, 2531-2537.

- Gonzalez Pedraza J., Sanandres N.P., Varela Z.S., Aguirre E.H. & Camacho J.V. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30, 73-94.
- Gonzalez, A.B. (1966). Lactose-fermenting *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, 91, 1661-1662.
- Gosling, R.J., Breslin, M., Fenner, J., Vaughan, K., West, E. & Mawhinney, I. (2016). An in-vitro investigation into the efficacy of disinfectants used in the duck industry against *Salmonella*. *Avian Pathol.*, 45 (5), 576-581 DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1188369>.
- Gradel, K.O., Randall, L., Sayers, A. & Davies, R.H. (2005). Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of *mar*. *Vet. Microbiol.*, 107, 127-138.
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K. & Römling, U. (2010). Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology*, 192, 456-466.
- GraphPad Software. (2023). McNemar's test to analyze a matched casecontrol study. <https://www.graphpad.com/quickcalcs/McNemar1.cfm>
- Graziani, C., Busani, L., Dionisi, A.M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Ricci, A., Mancin, M., Caprioli, A. & Luzzi, I. (2007). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet. Microbiol.*, 128, 414-418.
- Green, C.E. (1998). Capítulo 94. Factores ambientales en las enfermedades infecciosas. En: Greene CE., editor. *Enfermedades infecciosas de perros y gatos*. Filadelfia: WB Saunders Company. págs. 673-683; Morley PD. Bioseguridad de las prácticas veterinarias. *Vet. Clin. Food Anim.* 2002, 18, 133-155.
- Grimont, P.A.D. & Weill, F.X. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur. 1-166
- Grooms, D. (2003). Biosecurity guide for livestock farm visits. Michigan State University Extension Bulletin E2842.
- Guard-Petter, J. (2001). The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environmental Microbiology*, 3, 421-430.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: A review. *Arch. Microbiol.*, 198, 1-15.

-
- Gutiérrez Cogco, L., Montiel Vázquez, E., Aguilera Pérez, P. & González Andrade M.C. (200). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México, 42(6). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10642606>
 - Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A. & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. Frontiers in microbiology, 7, 825.
 - Hammack, T.S., Amaguaña, R.M., June, G.A., Sherrod, P.S. & Andrews, W. (1999). Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* spp. from foods with a low microbial. Journal of Food Protection, 62, 16-21.
 - Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. & Normark S. (1995). Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. Mol. Microbiology, 18, 661-670.
 - Hammar, M.R., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. & Normark, S. (1995). Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. Molecular microbiology, 18, 661-670.
 - Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol., 86(6), 985-990.
 - Harrison, W.A., Griffith, C.J., Tennant, D. & Peters, A.C. (2001). Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in south Wales. Letters in Applied Microbiology, 33, 450-454.
 - Hata, H., Natori, T., Mizuno, T., Kanazawa, I., Eldesouky, I., Hayashi, M., Miyata, M., Fukunaga, H., Ohji, S., Hosoyama, A., Aono, E., Yamazoe, A., Tsuchikane, K., Fujita, N. & Ezaki, T. (2016). Phylogenetics of family *Enterobacteriaceae* and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 60, 303-311.
 - Hayes, P.R. & Forsythe, S J. (1998). Food hygiene, microbiology and HACCP. Springer Science & Business Media.
 - Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt P. & Molbak, K. (2002). Excess mortality associated with antimicrobial drug resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 5, 490-495.
 - Hernández-Navarrete, M.J., Celorrio-Pascual, J.M., Lapresta Moros, C. & Solano Bernad, V.M. (2014). Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 32, 681-688.

-
- Hess, S.C, Peres, M.T.L P., Batista, A.L., Rodrigues, J.P., Tivioli, S.C., Oliveira, L.G.L., Santos, C.W.C., Fedel, L.E.S., Crispim, S.A.M., Smania Junior, A., Smania, E.F.A., Flacha & Pantaroto, S. (2007). Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elionurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). *Quim. Nova.* 30, 370-373.
 - Heydorn, S., Menné, T., Andersen, K.E., Bruze, M., Svedman, C. & White, I.R. (2003). Citral, a fragrance allergen and irritant. *Contact dermatitis*, 49, 32-36.
 - Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerdt, K. & Zutter, L. (2002). Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: Epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology & Infection*, 129, 253-265.
 - Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B. & Calder, P.C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.
 - Hoffmann, T.M., Pitura, G.N. & Bueno, D.J. (2022). Comparación de métodos fenotípicos de sensibilidad a colistina en cepas de *Salmonella* serovar Enteritidis. Libro de resúmenes del XX Jornadas Argentinas de Microbiología. Estrategias de diagnóstico rápido en microbiología clínica. (Virtual). 7-8 de septiembre.
 - Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 35(4), 322-332.
 - Hosmer, D.W. & Lemeshow S. (2004). *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons eds New Jersey, USA.
 - Howard, Z.R., O'Bryan, A.C., Crandall, P.G. & Ricke, S. C. (2012). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res. Int.*, 45, 755-764.
 - Hu, D., Zhang, R., Zou, Y., Zhong, H., Zhang, E.S., Luo, X., Wang, Y. & Jiang, Y. (2017). The structure-activity relationship of pterostilbene against *Candida albicans* biofilms. *Molecules*, 22, 360-371.
 - Hulankova, R., Borilova, G. & Steinhäuserova, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Sci.*, 95(2), 190-194.
 - Humphrey, T.J., Chart, H., Baskerville, A. & Rowe, B. (1991). The influence of age on the response of SPF hens to infection with *Salmonella* Enteritidis PT4. *Epidemiol. Infect.*, 106, 33-43.
 - Ian, C., Marilyn, R., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*,
-

65(3), 232260.

- IFT (Institute of Food Technologists) (2006). Antimicrobial resistance: Implications for the Food System. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 5(3), 71-137.
- Im, M.C., Jeong, S.J., Kwon, Y.K., Jeong, O.M., Kang, M.S., Lee, Y.J. (2015). Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from commercial layer farms in Korea. *Poultry Science*, 94, 1691-1698.
- International Organization for Standardization, ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020. (2020) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC
- International Organization for Standardization. (2002). ISO 6579:2002 Annex D. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Itram Higiene.(2020). BiôFinder. <https://itramhigiene.com/wp-content/uploads/2020/07/FT-BIOFINDER-ES.pdf>
- Jeffrey, D.J. (1995). Productos químicos utilizados como desinfectantes: ingredientes activos y aditivos potenciadores. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 14(1), 57-74.
- Jones, F.T. & Richardson, K.E. (2004). *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poultry Science*, 83, 384-391.
- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 367-372.
- Jurgens, D. J., Sattar, S. A. & Mah, T. F. (2008). Chloraminated drinking water does not generate bacterial resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(5), 562-567.
- Justesen, U. & Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*. 73, 245-250.
- Kahrs, R.F. (1995). Principios generales de la desinfección. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 14 (1), 143-163.
- Kang, M.S., Kim, A., Jung, B.Y., Her, M., Jeong, W., Cho, Y.M., Oh, J.Y., Lee, Y.J., Kwon, J.H. & Kwon, Y.K. (2010). Characterization of antimicrobial resistance of recent

Salmonella enterica serovar Gallinarum isolates from chickens in South Korea. Avian. Pathol., 39, 201-205.

- Karaca, B., Akcelik, N. & Akcelik, M. (2013). Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. Biologia, 68(1), 1-10.
- Karadağ, A.E., Demirci, B., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M.E., Orak, D., Sipahi, H. & Başer, K.H.C. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of Rosmarinus officinalis L. flower extract fractions. South African Journal of Botany, 125, 214-220.
- Karim, N., Khan, I., Abdelhalim, A., Abdel-Halim, H. & Hanrahan, J.R. (2017). Molecular docking and anti-amnesic effects of nepitrin isolated from Rosmarinus officinalis on scopolamine-induced memory impairment in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy, 96, 700-709. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.121>
- Kennedy, J., Bek, J. & Griffin, D. (2000). Selection and use of disinfectants. University of Nebraska Cooperative Extension G00-1410-A.
- Kim, Y. & Kim, S.H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. Biochemical and biophysical research communications, 379(2), 324-329.
- King, S. & Metzger, W.I. (1968). A new plating medium for the isolation of enteric pathogens, Hektoen enteric agar. Applied Microbiology, 16, 577-578.
- Kobayashi, F., Sainyo, Y., Koshi, T., Hattori, Y., Nakayama, M., Iwasaki, A., Mori, T. & Mitsuhashi, S. (1982). Antimicrobial and Beta-lactamase inhibitory activities of carpetimycins A and B, new carbapenem antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother., 21, 536-544.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. & Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of greek oregano. Phytochem., 44(5), 883-886.
- Kolb, E., Kolb, N., Ferreyra, D.J., Uliana, R.F., Celaya, L.S., Puglisi, C., Miño, R.A. & Huk, J. (2012). Poaceas de Misiones: quimiotipos de *Elionurus muticus*. Dominguezia 28, 76.
- Kolb, N., Ferrera, D., Kolb, E., Rodriguez, R. & Vivero L. (2007). Evaluación de la aptitud del espartillo para su explotación comercial. Misiones: Universidad Nacional de Misiones. <http://www.unam.edu.ar/index.php?option=comcontent&task=view&id=243&Itemid=123>
- Koshima, F.A.T., Ming, L.C. & Marques, M.O.M. (2006). Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. Revista Bras. Pl. Med. 8, 112-116.

-
- Koyunku, S. & Haggblom, P. (2009). A Comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. BMC Vet. Res., 5, 6.
 - Kramer, J.M., Frost, J.A., Bolton, F. J. & Wareing, D.R.A. (2000). *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: Identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. Journal of Food Protection, 63, 1654-1659.
 - Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D. & Sela, S. (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. Applied and environmental microbiology, 75, 6076-6086.
 - Kruger, N., Buhler, C., Iwobi, A., Huber, I., Ellerbroek, L., Appel, B. & Stingl, K. (2014). "Limits of control"—crucial parameters for a reliable quantification of viable campylobacter by real-time PCR. PLoS ONE, 9, e88108.
 - Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiol. 46, 165-170.
 - Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied and Environmental Microbiology, 46, 165-170.
 - Kumar, G. & Anand, P. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International J. Food Microbiol., 42, 9-27.
 - Kyprianou, M. (2006). Commission Regulation (EC) No 1168/2006 of 31 July 2006 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 as regards a Community target for the reduction of the prevalence of certain salmonella serotypes in laying hens of *Gallus gallus* and amending. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1168&from=EN>.
 - Lahlou, M. & Berrada, R. (2003). Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* acclimatised in Morocco. Flavours and Fragrances Journal, 18, 124-127.
 - Lamas, A., Regal, P., San Julián, L., López-Santamarina, A., Manuel Franco, C. & Cepeda, A. (2021). An Overview of Salmonella Biofilms and the Use of Bacteriocins and Bacteriophages as New Control Alternatives. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.98208
 - Lamelas, K., Mair, G. & Beczkowski, G. (2011). Boletín avícola: anuario 2010. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 61, 1-43.
 - Lapidot, A. & Yaron, S. (2009). Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
-

from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *Journal of Food Protection*, 72, 618-623.

- Lapidot, A., Römling, U. & Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 229-233.
- Latasa, C., García, B., Echeverez, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., García-del Portillo, F., Solano, C. & Lasa, I. (2012). *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *J. Bacteriol.*, 194(14), 3708-3722.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penadés, J.R. & Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular microbiology*, 58(5), 1322-1339.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J., & Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, 329, 849-857.
- Laurence, L.B., John, S.L. & Keith, L.P. (2006). Googman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. *J. Chem. Inf. Model.*, 53.
- Leach, K.L., Swaney, S.M., Colca, J.R., McDonald, W.G., Blinn, J.R. & Thomasco, L.M.M., (2007). The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol. Cell*, 26(3), 393402.
- Lee, S.K., Chon, J.W., Song, K.Y., Hyeon, J.Y., Moon, J.S. & Seo, K.H. (2013). Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poult Sci.*, 92(10), 2789-2797.
- Lee, Y.J., Kim, K.S., Kwon, Y.K. & Tak, R.B. (2003). Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated in Korea. *J. Vet. Sci.*, 4, 161-166.
- Leifson, E. (1935). New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Pathol. Bacteriol.*, 40, 581.
- Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 107-131.
- Ley 27680. (2022). Ley de prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/270118/20220824>
- Li, S. & Shah, N.P. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of sulphated

polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. Food chemistry, 165, 262-270.

- Lianou, A. & Koutsoumanis, K. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. Int. J. Food Microbiol., 160 (2), 171-178.
- Liao, C.H., & Fett, W.F. (2003). Isolation of *Salmonella* from alfalfa seed and demonstration of impaired growth of heat-injured cells in seed homogenates. Int. J. Food Microbiol., 82, 245-253.
- Lim, Y. H., Hirose, K., Izumiya, H., Arakawa, E., Takahashi, H., Terajima, J., Itoh, K., Tamura, K., Kim S.I. & Watanabe, H. (2003). Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella Enterica* serovar Typhimurium. Japan J. Infect. Dis., 56, 151-155.
- Linares, J., Gustafsson, I., Baquero, F. & Martinez, J. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 19484-19489.
- Lister, S. (2008). Biosecurity in poultry management. Páginas 48-65 en Poultry Diseases. M. Pattison, P. F. McMullin, J. M. Bradbury y D. J. Alexander eds. Elsevier Ltd
- Livermore, D.M., Warner, M., Mushtaq, S., Doumith, M., Zhang J. & Woodford, N. (2011). What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. Int. J. Antimicrob. Agents., 37, 415-419.
- Loharikar, A., Vawter, S., Warren, K., Deasy, M., Moll, M., Sandt, C., Gilhousen, R., Villamil, E., Briere, E., Schwensohn, C., Trees, E., Lafon, P., Adams, J.K., & Barton Behravesh, C. (2013). Outbreak of human *Salmonella* Typhimurium infections linked to contact with baby poultry from a single agricultural feed store chain and mail-order hatchery, 2009. Pediatr. Infect. Dis. J., 32, 8-12.
- Love, B.C. & Rostagno, M.H. (2008). Comparison of five culture methods for *Salmonella* isolation from swine fecal samples of known infection status. J. Vet. Diagn. Invest., 20, 620-624.
- Luque Gómez, P. & Mareca Doñate, R. (2019) Conceptos básicos sobre antisepsia y antisépticos Medicina Intensiva, 43, 2-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.medin.2018.11.003>
- Madsen, H. & Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants, Trends in food science & technology, 6(8), 271-277.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., L. Rice, B.,

Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. & Monne, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(3), 268-281.

- Mah, T. & O'Toole, G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34-39.
- Maillard, J.Y. & Centeleghe, I. (2023) How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrob Resist Infect Control*, 12(1), 95.
- Maillard, J.Y. & Centeleghe, I. (2023). How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 12, 95.
- Mair, G. (2023). Influenza aviar, impacto en la producción avícola. 14º Ciclo de Conferencias Técnicas en Avicultura, Módulo 1.
- Majtan, J., Majtánová, L., Xu, M. & Majtán, V. (2008). In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia. *Journal of applied microbiology*, 104(5), 1294-1301.
- Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R. & Rychlik, I. (2008). Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 129(3), 360-366.
- Malcova, M., Karasova, D. & Rychlik, I. (2008). *aroA* and *aroD* mutations influence biofilm formation in *Salmonella* Enteritidis. *Fems Microbiol. Lett.*, 291, 44-49.
- Maldonado, N.C., Silva de Ruiz, C., Cecilia, M. & Nader-Macias, M.E. (2007). A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology*, 52-59.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. & Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 290-296
- Mancini, S. (2013). Estudio retrospectivo de casos y brotes de salmonelosis ocurridos en la ciudad de Viedma, período 2000–2010. Tesina para Grado de Especialista en Salud Pública Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/rdata/tespo/v_manest771.pdf
- Mandal, B.K. (2016). Chapter 9-Scopes of Green Synthesized Metal and Metal Oxide Nanomaterials in Antimicrobial Therapy. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*;

Grumezescu, A.M., Ed.; William Andrew Publishing: Cambridge, MA, USA, pp. 313–341.

- Mangalappalli-Illathu, A. & Korber, D. (2006). Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3588-3596.
- Mangalappalli-Illathu, A., Vidovic S. & Korber, D. (2008). Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3669-3680.
- Manzanilla, E., Pérez, J., Martín, M., Kamel, C., Baucells, F. & Gasa, J. (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82, 3210-3218.
- Marin, C., Balasch, S., Vega, M. & Lainez. (2011). Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 98, 39-45.
- Marin, C., Hernandez, A. & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88, 424-431.
- Marion-Ferey, K., Pasmore, M., Stoodley, P., Wilson, S., Husson, G.P. & Costerton, J.W. (2003). Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection*, 53(1), 64-71.
- Marion-Ferey, K., Pasmore, M., Stoodley, P., Wilson, S., Husson, G.P. & Costerton, J.W. (2003). Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection*, 53(1), 64-71.
- Maris, P. (1995). Modes of action of desinfectantes. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 14(1), 47-55.
- Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T. & Tatone, F.A. (2017). Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLOS ONE*, 12, (6), e0178897. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178897>
- Martin, S.W. (1977). The evaluation of tests. *Can. J. Comp. Med.*, 41, 19–25.
- Martínez, M. (2014). Evaluación Antibacteriana y antioxidante de extractos de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia. Tesis de Grado, Ingeniería-Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria-México.

-
- Martínez, R. & Borghello, C. (2019). Informe avícola 2019. Dirección de Ganadería y Pesca de la provincia de Entre Ríos. <http://www.entrieros.gov.ar/minpro/userfiles/files/DIRECCION%20GRAL%20GANADERIA/AVICULTURA/INFORME%20AV%20C3%8DCOLA%202019.pdf>
 - Martínez-Domínguez, M. (1991). Innovación tecnológica para efficientar el rendimiento en cosecha de orégano *Lippia berlandieri* Shawer. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (México). Centro Regional de Investigación Forestal y Agropecuaria del Pacífico Centro. Estado de Jalisco. Reunion Científica Forestal y Agropecuaria del Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Resúmenes. Guadalajara, Jalisco (México). 5, 104.
 - Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V. & Matteuzzi, D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 884-893.
 - Mateu, E., & Casal, J. (2003). Tamaño de la muestra. *Revista Epidemiología Medicina Preventiva*, 1, 8-14.
 - Matlho, G., Himathongkham, S., Riemann, H. & Kass, P. (1997). Destruction of *Salmonella* Enteritidis in poultry feed by combination of heat and propionic acid. *Avian Diseases*, 41, 58-61.
 - Maukonen, J., Matto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 327-356.
 - McGeer A., Fleming C.A., Gree K. & Low D.E. (2001). Antimicrobial resistance in Ontario: Are we making progress? *Laboratory Proficiency Testing Program Newsletter*. 293, 1-2.
 - McLaren, I., Wales, A., Breslin, M. & Davies, R. (2011) Evaluation of commonly used farm disinfectants in wet and dry models of *Salmonella* farm contamination. *Avian Pathol.*, 40 (1), 33–42. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.537303>
 - Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E. & Simões, M. (2016). The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140-146.
 - Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E. & Simões, M. (2016). The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140-146.
 - Mercer, M.A. (2022). MSD Manual Veterinary Manual. Macrolide use in animals. <https://www.msdsmanual.com/pharmacology/antibacterial-agents/macrolide-use-in-animals#:~:text=The%20macrolides%20are%20used%20to,of%20streptococcal%20and%20>
-

[20staphylococcal%20infections.](#)

- Merino, L., Trejo, F.M., De Antoni, G. & Golowczyc, M.A. (2019). *Lactobacillus* strains inhibit biofilm formation of *Salmonella* sp. isolates from poultry. Food Res Int., 123, 258-265.
 - Messens, W., Grijspeerdt, K. & Herman, L. (2006). Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. World's Poult. Sci. J., 61, 71-85.
 - Mgomi, F.C., Yang, Y.R., Cheng, G. & Yang, Z.Q. (2023). Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. Biofilm, 100118.
 - Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. & Chaieb, K. (2017). Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. Microbial Pathogenesis, 104, 56-63.
 - Miles, A.A., Misra, S.S. & Irwin, J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. J. Hyg., 38, 732-749.
 - Milos, M., Mastelic, J. & Jerkovic, I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum). Food Chem., 71, 79-83.
 - Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. (2010). Norma Técnica para certificacao sanitária de estabelecimentos avícolas de reproducao e monitoramento dos estabelecimentos avícolas comerciais. Portaria N° 297. <https://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/portaria29720100621.pdf>.
 - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación. (2016). Boletín Avícola, Anuario 2016. http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/_archivos//000001Boletines/000077_Nro77%20Julio%202016.pdf.
 - Ministerio de producción de Entre Ríos. (2012). Dirección general de Ganadería. Información de la actividad avícola en Entre Ríos. http://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/Avicultura_%202012.pdf.
 - Ministerio de Producción, Turismo y Desarrollo Económico de Entre Ríos. 2020. "La avicultura crece y genera 22.000 empleos en la provincia." https://www.entrerios.gov.ar/minpro/index.php?codigo=&cod=2016&noticia=ver_noticia&modulo=noticia.
 - Ministerio de Producción, Turismo y Desarrollo Económico. (2015). Dirección General de Producción Animal. <http://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVICULTUR>
-

[A/FRIGORIFI%20AVES%20HABILITADAS/FRIGORIFICOS%20DE%20AVES%20HABILITADOS.pdf](#)

- Ministerio de Salud. (2011).. Resolución 1812/2011. Créase el Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/185000-189999/189688/norma.htm>
- Ministerio de Sanidad, España. (2018). Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica o resumen de las características del producto. https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/2335%20ESP/2335_ESP_ft.pdf
- Ministerio de Sanidad. España. (2020). Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Resumen de las características del producto. https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/1646%20ESP/1646_ESP_ft.pdf
- Ministerio de Trabajo Empleo y Seguridad Social. Argentina. (2021). Guía de Antisépticos y Desinfectantes del Ministerio de Trabajo Empleo y Seguridad Social. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/guia_desinfectantes_y_antisepticos_septiembre_2021_0.pdf
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G. & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science and Nutrition*, 2(4), 403-416.
- Moganedi, K.L.M., Goyvaerts, E.M.A., Venter, S.N. & Sibara, M.M. (2007). Optimization of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. *Water S.A.*, 33,195-202.
- Mohr, H.K., Trenk, H.L. & Yeterian, M. (1974). Comparison of fluorescent- antibody methods and enrichment serology for the detection of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.*, 27, 324-328.
- Mølbak, K., Olsen, J.E., & Wegener, H.C. (2006). *Salmonella* infections. In *Foodborne Infections and Intoxications*. 3rd edition. Edited by Riemann HP, Cliver DO. The Netherlands: Elsevier; pp:57–136.
- Molla, B. & Mesfin, A. (2003). A survey of *Salmonella* contamination in chicken carcass and giblets. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154, 267-270.
- Mollenhorst, H., van Woudenberg, C.J., Bokkers, E.G. & de Boer, I. J. (2005). Risk factors for *Salmonella* Enteritidis infections in laying hens. *Poult. Sci.*, 84, 1308-1313.
- Montville, T.J. & Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied microbiology and Biotechnology*, 50(5), 511-519.
- Montville, T.J. & Mathews, K.R. (2008). *Food microbiology: An introduction*. ASM Press,

Washington D.C., U.S.A.

- Moretro, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K. & Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 1005-1012.
- Morley, P.S. (2002). Biosecurity of veterinaria Practices. *Vet Clin Food Anim.*, 18, 133-155.
- Muchuweti, M., Kativu, E., Ndhlala, A.R., Mupure, C., Chidewe, C. & Benhura M.A.N. (2007). Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. *Afr. J. Biochem. Res.* 1: 137-141.
- Mueller-Doblies, D., Carrique-Mas, J.J., Sayers, A.R. & Davies, R.H. (2010). A comparison of the efficacy of different disinfection methods in eliminating *Salmonella* contamination from turkey houses. *J. Appl. Microbiol.*, 109, (2), 471-479.
- Muñoz Acevedo, A., Castañeda, M.L., Blanco, K.M., Cardenas, C.Y., Reyes, J.A., Kouznetsov, V.V. & Stashenko, E.E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de TIMOL Y CARVACROL. *Scientia Et Technica*, XIII (33), 125-128.
- Myint, M.S., Johnson, Y.J., Tablante, N.L. & Heckert, R.A (2006). The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol.* 23, 599-604.
- Nakajima, Y. (1999). Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infectious and Chemotherapy*, 5, 61-74.
- Namata, H., Meroc, E., Aerts, M., Faes, C., Abrahantes, J.C., Imberechts, H. & Mintiens, K. (2008). *Salmonella* in Belgian laying hens: an identification of risk factors. *Prev. Vet. Med.* 83, 323-336.
- Navia, P., Villada, H. & Mosquera, S. (2010). Las biopelículas en la industria de alimentos. *Facd. Cs. Agr.*, 8, (2), 118-128.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol.*, 67 (1), 161-172.
- Nemeth, J., Oesch, G. & Kuster, S.P. (2015). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob. Chemother.*, 70(2), 382-395.
- Neu, T. & Lawrence, J. (2014). Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 146, 1-51.

-
- Nguyen, C., Jung, W., Kim, J., Chaney, E., Novak, M., Stewart, C. & Boppart, S. (2012). Noninvasive *in vivo* optical detection of biofilm in the human middle ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 109, 9529-9534.
 - Ni, N., Li, M., Wang, J. & Wang, B. (2009). Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Medicinal research reviews*, 29(1), 65-124.
 - Niemira, B. & Solomon, E. (2005). Sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Salmonella* spp. to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2732-2736.
 - Nocker, A., Cheung, C. & Camper, A. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 310-320.
 - Noguera, B. (2020). Principales métodos de extracción de aceites esenciales. <https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/08/extraccion-aceites-esenciales-principales-metodos.html>
 - Nunes, F.G. (2020). Corazón, hígado y mollejas, alto valor en el procesamiento avícola. <https://avinews.com/corazon-higado-y-mollejas-alto-valor-en-el-procesamiento-avicola/>
 - OIE (Oficina Internacional de Epizootias). (2008). Manual de la OIE sobre animales terrestres. SALMONELOSIS. 1-18 <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>
 - OIE (Oficina Internacional de Epizootias). (2018). Informe anual de la OIE sobre los agentes antimicrobianos destinados a ser utilizados en los animales. Tercer Informe. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_Third_Annual_Report_AMR.pdf.
 - OIE (Oficina Internacional de Epizootias). (2019). Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf.
 - Oladimeji, F., Orafidiya, O., Okeke, I. & Dagne, E. (2001). Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 2(11), 64-67.
 - Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J. & Oliveira, R. (2007). Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 318-323.
 - Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. & Read, R.R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary*

Research, 66(2), 86-92.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019). Antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana. 6.^a revisión, 2018. Clasificación de los antimicrobianos de importancia médica para gestionar el riesgo de resistencia a los antimicrobianos debido a su uso no humano. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331531/9789243515526-spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2022). SALMONELLOSIS. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.10.07_SALMONELLOSIS.pdf
- OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2023). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Recomendaciones generales relativas a la desinfección y desinsección. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_desinfect_disinsect.pdf.
- OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2023. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista de la omsa. https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_oie_listed_disease.htm
- Omwandho, C.O.A. & Kubota, T.(2010). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: a mini review of contamination routes and limitations to effective control. Jpn. Agric. Res. Q., 44, 7-16.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (2022). Argentina, primer país de la región con ley de prevención y control de la resistencia antimicrobiana desde el enfoque “Una Salud”. <https://www.paho.org/es/noticias/4-11-2022-argentina-primer-pais-region-con-ley-prevencion-control-resistencia>.
- OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud). (2011). Mesa redonda sobre la resistencia a los antimicrobianos. Contener la resistencia a los antimicrobianos. Washington. http://www.paho.org/HQ/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&qid=16011&lang=es
- Orden Gutiérrez, J.A. & de la Fuente López, R. (2001). Impact on public health of quinolone resistance in animal-origin bacteria. Rev. Esp. Salud Pública, 75, (4), 313-320.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. 2021. Manual de limpieza y desinfección en salud animal. Segunda edición. <https://www.oirsa.org/contenido/2020-2/2021/Manual%20Limpieza%20Desinfecci%C3%B3n%20V5.pdf>

-
- Ospina, S. (2015). La importancia de la limpieza y desinfección en las granjas. <http://www.ciap.org.ar/Sitio/Archivos/La%20importancia%20de%20la%20limpieza%20y%20desinfeccion%20en%20las%20granjas.pdf>
 - Ouali, F.A., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D. & Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International journal of food microbiology*, 191, 116-124.
 - OXOID. 2006. The Oxoid Manual. 9th Edition Compiled by E. Y. Bridson. Published by OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England pp 2–246.. http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/manuales/oxoid-manual-9th-edition.pdf
 - Ozkan, A., Topal, A., Dana, A., Guler, M. & Tekinay, A. (2016). Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. *Micron.*, 89, 60-76. Países Bajos. Wageningen University.
 - Palaniappan, K. & Holley, R. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2), 164-168.
 - Pan, P., Harper, S., Ricci-Nittel, D., Lux, R. & Shi, W. (2010). In-vitro evidence for efficiency of antimicrobial mouthrinses. *Journal of Dental Research*, 38, 16-20.
 - Pan, Y., Breidt, F. & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), 7711-7717.
 - Pande, V., McWhorter, A. & Chousalkar, K. (2016). *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. *Biofouling*, 32, 699-710.
 - Paolilli, M.C., Iglesias, B. Cabrini, S.M., Fillat, F.A. & Pagliaricci L.O. (2021). La cadena del huevo en Argentina https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_pergamino_la_cadena_del_huevo_en_argentina_0.pdf
 - Papavasileiou, K., Papavasileiou, E., Tseleni-Kotsoyili, A., Bersimis, S., Nicolaou, C., & Ioannidis, A. (2010). Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica* strains isolated from children with gastroenteritis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 1401-1405.
 - Papp-Wallace, K., Endimiani, A., Taracila, M. & Bonomo, R. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(11), 4943-4960.
-

-
- Parry, C. & Threlfall, E. (2008). Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21, 531-538.
 - Parsek, M.R. & Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.
 - Parsek, M.R. & Tolker-Nielsen, T. (2008). Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current opinion in microbiology*, 11(6), 560-566.
 - Patel, G. & Bonomo, R.A. (2011). Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 9, 555-570.
 - Patel, P., Wermuth, H.R., Calhoun, C. & Hall, G.A. (2023). Antibiotics. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
 - Patiño, D.C. (2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. *Umbral Científico*. Colombia. p. 48-56.
 - Pattinson, M. (2008). *Poultry diseases*. 6^a ed. Elsevier Health Sciences.
 - Paytubi, S., Cansado, C., Madrid, C. & Balsalobre, C. (2017). Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2160. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02160>
 - Peeters, E., Nelis, H. & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72, 157-165.
 - Pegler, S. & Healy, B. (2007). In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *BMJ*, 335(7627), 991.
 - Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C. & Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of Orégano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188-199.
 - Petersen, L.A. (1997). Comparison of EF-18 agar and modified brilliant green agar with Lutensit for isolation of *Salmonella* from poultry samples. *Acta Vet. Scand.*, 38, 79-85.
 - Petrin, S., Mancin, M., Losasso, C., Deotto, S., Olsen, J. E. & Barco, L. (2022). Effect of pH and salinity on the ability of *Salmonella* serotypes to form biofilm. *Frontiers in Microbiology*, 13, 821679.
 - Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C.H., Jones, R., Nightingale, C.H., Preston, R. & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health?. A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother*, 53, 28-52.
-

-
- Pieskus, J., Franciosini, M.P., Casagrande Proietti, P., Reich, F., Kazeniauskas, E., Butrimaite Ambrozeviciene, C., Mykolas, M. & Bolder, N. (2008). Preliminary Investigations on *Salmonella* spp. incidence in meat chicken farms in Italy, Germany, Lithuania and the Netherlands. *International Journal of Poultry Science*, 7(8), 813-817.
 - Pires de Campos, A.C.L, Saldanha Nandi, R.D., Scandorieiro, S., Chue Gonçalves, M.C, Fonseca Reis, G., Dibo, M., Pinto Medeiros, L., Aparecido Panagio, L., Paulo Fagan, E., Takayama Kobayashi, R.K. & Nakazato, G. (2022). *LWT-Food Science and Technology*, 157, 113063.
 - Pitts, B., Hamilton, M., Zelter, N. & Stewart P. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 269-276.
 - Poppe, C., Irwin, R.J., Messier, S., Finley, G.G., & Oggel, J. (1991). The prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiology and Infection*, 107, 201-211.
 - Poppe, C., Mann, E.D., Shaw, S. Warburton, D. & Sewell, A. (2004). Procedure for the isolation of *Salmonella* species by the modified semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) method. Health Canada, Health Products and Food Branch, Ottawa, ON, Canada.
 - Potenski, C.J., Gandhi, M. & Matthews, K.R. (2003). Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220(2), 181-186.
 - Pournaras, S., Poulou, A., Voulgari, E., Vrioni, G., Kristo, I. & Tsakris, A. (2010). Detection of the new metallo-beta-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65, 1604-1607.
 - Powrie, W.D. & Nakai, S. (1986). The chemistry of eggs and egg products. In W. J. Stadelman, & O. J. Cotterill (Eds.), *Egg science and technology*. Westport, Connecticut: Avi Publishing Co.
 - Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(39), 1-8.
 - Proux, K., Humbert, F., Jouy, E., Houdayer, C., Lalande, F., Oger, A. & Salvat, G. (2002). Improvements required for the detection of *Salmonella* Pullorum and Gallinarum. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66, 151-157.
 - Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Lee, H.Y., Tang, J.Y.H., Noorlis, A. & Son, R. (2011). Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal*, 18(1), 31-38.
-

-
- Quinn, P.J. & Markey, B.K. (2001). Desinfección y prevención de enfermedades en medicina veterinaria. En: Bloque SS, editor. Desinfección, esterilización y conservación. 5ª edición. Filadelfia: Lippincott, Williams & Wilkins, págs. 1069-1103.
 - Quintana, S.E., Villanueva, D., Reglero, G., García, M.R. & Fornari, T. (2019). Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts. *Journal of CO2 Utilization*, 34, 479-489. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.032>
 - Ramesh, N., Joseph, S.W., Carr, L.E., Douglass, L.W. & Wheaton, F.W. (2002). Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry Science*, 81(6), 904-910.
 - Ramos, A.N., Gobbato, N., Rachid, M., Gonzalez, L., Yantorno, O. & Valdez, J.C. (2010). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Pseudomonas aeruginosa* culture supernatants on polymorphonuclear damage and inflammatory response. *International immunopharmacology*, 10(2), 247-251.
 - Rappold, H. & Bolderdijk, R.F. (1979). Modified lysine iron agar for isolation of *Salmonella* from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1), 162-163.
 - Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., De Simone, F. & Aquino, R. (1998). Iridoids from *Lippia galeolens*. *Phytochem.* 49(6), 1829-1832.
 - Reglamento (UE) 2019/268. (2019). Comisión Europea <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32019R0268&from=ES>
 - Reina, J., Gomez, J., Serra, A. & Borell, N. (1993). Analysis of the antibiotic resistance detected in 2043 strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in stool cultures of Spanish patients with acute diarrhea (1986/1991). *J. Antimicrob. Chemother.* 32, 765-769.
 - Rendueles, O. & Ghigo, J.M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5), 972-989.
 - Rice, L.B. (2000). Bacterial Monopolist: The Bundling and Dissemination of antimicrobial Resistance Genes in Gram Positive Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 762-769.
 - Rincón, L. (2007). Estudio del efecto antimicrobiano del aceite de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
 - Ríos, E. A., Martínez, R. & Borghello, C. (2019). Dirección de Ganadería y Pesca. Gobierno de Entre Ríos. Informe Avícola 2019. <http://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/DIRECCION%20GRAL%20GANADERIA/AVICULTURA/INFORME%20AV%20C3%8DCOLA%202019.pdf>
 - Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J. &
-

Minor, L. (2013). Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

- Rodrigo, S., Adesiyun, A., Asgarali, Z. & Swanston, W. (2006). Occurrence of selected foodborne pathogens on poultry and poultry giblets from small retail processing operations in Trinidad. *Journal of Food Protection*, 69, 1096-1105.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J. & Oliveira, R. (2006a). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- Rodrigues, L., Van der Mei, H. C., Teixeira, J. & Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7), 4408-4410.
- Rodrigues, L.R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C. & Oliveira, R. (2006b). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 79-86.
- Rodríguez, F.I., Godano, E.I. & Bueno, D.J. (2016). La producción de huevo en Argentina. <https://avinews.com/la-produccion-huevo-argentina/>.
- Rodríguez, F.I., Procura, F. & Bueno, D.J. (2018). Comparison of 7 culture methods for *Salmonella* serovar Enteritidis and *Salmonella* serovar Typhimurium isolation in poultry feces. *Poultry Science*, 97 (11), 3826-3836.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B.A., Ortega-Ramirez, L.A., Leyva, J.M., Siddiqui, M.W., Cruz-Valenzuela, M.R. & Ayala-Zavala, J.F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.*, 56(10), 1717-1727. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>
- Roehm, N., Rodgers, G., Hatfield, S. & Glasebrook, A. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142, 257-265.
- Rojas, M.J., Garcia, M. & Masdeu, V. (2002). Resultados del análisis microbiológico de yacijas de paja de arroz utilizadas en la avicultura. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 26, 121-123.
- Roll, V.F.B., Dai Pra, M.A. & Roll, A.P. (2011). Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. *Poultry Science*, 90, 2257-2262.
- Römling, U. & Rohde, M. (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level, 180, 91-102.
- Römling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M.Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel

bacterial signalling system. *Molecular microbiology*, 57, 629-639.

- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S. & Reinköster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.*, 36, (1), 10-23.
- Römling, U., Sierralta, W., Eriksson, K. & Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Molecular microbiology*, 28, 249-264.
- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J., Rose, V. & Colin, P. (2000). Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. *Preventive Veterinary Medicine*, 44, 9-20.
- Rose, N., Mariani, J., Drouin, P., Toux, J., Rose, V. & Colin, P. (2003). A decision-support system for *Salmonella* in broiler chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 59, 27-42.
- Rosselot, V., Van Baren, C.M., Juárez, M.A., Di Leo Lira, P., Martinez A.J., Retta D., Elechosa M.A. & Bandoni A.L. (2018). Evaluación de un clon de “espartillo”, quimiotipo citral, *Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze cultivado en INTA Castelar. <https://www.dominguezia.org/volumen/articulos/34S08.pdf>
- Rota, C., Carramiñana, J., Burillo, J. & Herrera, A (2004). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1252-1256.
- Ruiz, J. (2016). Prevención de *Salmonella* spp. en alimento balanceado. https://www.engormix.com/avicultura/salmonella-aves/prevencion-salmonella-spp-alimento_a32927/
- Rusli, N.S., Lani, M.N., Shahabudin, S., Azmi, N.S., Taghavi, E., Abdullah, W.Z.W. & Desa, M.N M. (2023). Antibiotic Susceptibility and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Fermented Foods Against Biofilm-Forming *Escherichia coli* Strains. *Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology*, 31(1), 168-182.
- Russell, A.D. (1999) Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* ed. Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. pp. 95-123. London: Blackwell Science Ltd.
- Russell, S.M., & Walker, J.M. (1997). The effect of evisceration on visible contamination and the microbiological profile of fresh broiler chicken carcasses using the Nu-Tech evisceration system and the conventional streamlined inspection system. *Poultry Science*, 76, 780-784.

-
- Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P. & Carnacini, A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3741-3746.
 - Rusul, G., Khair, J., Radu, S., Cheah, C.T. & Yassin, R.M. (1996). Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 183-194.
 - Rybolt, M.L., Wills, R.W., Byrd, J.A., Doler, T.P. & Bailey, R.H. (2004). Comparison of four *Salmonella* isolation techniques in four different inoculated matrices. *Poult. Sci.*, 83, 1112-1116
 - Sabini, L.I., Cordero Gabrieli, P., Torres, C.V., Escobar, F.M., Cacciabue, M., Rovera, M. & Kolb, N. (2006). Study of the citotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elionurus muticus* against *Candida* spp. *Mol. Med. Chem.* 11, 31-3.
 - Sachidanandham, R., Gin, K. & Poh C. (2005). Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 24-31.
 - Sadeh, D., Nitzan, N., Chaimovitsh, D., Shachter, A., Ghanim, M. & Dudai, N. (2019). Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Industrial Crops & Products*, 138, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.068>
 - Sadiq, F.A., Burmølle, M., Heyndrickx, M., Flint, S., Lu, W. & Chen, W. (2021). Community-wide changes reflecting bacterial interspecific interactions in multispecies biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 47 (3), 338-358.
 - Saeberg, A.C., Labbe, R.G. & Shetty, K. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*). *Food Biotechnol.*, 17(2), 129-149.
 - Sagdic, O., Kuscu, A., Ozcan, M. & Ozcelik, S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 19(5), 473-480.
 - Said, A., Zahlane, K., Ghalbane, I., Messoussi, S., Romane, A., Cavaleiro, C. & Salgueiro, L. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula coronopifolia* essential oil against antibiotic-resistant bacteria. *Natural Product Research*, 29(6), 582-585.
 - Sapers, G.M. (2003). Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products. In: Novak, J. S.; Sapers, G. M. and Juneja, V. K. (eds.). *Microbial safety of minimally processed foods*. CRS PRESS. USA. 221-253 pp.
-

-
- Sara Moreno, E.M., Almirón, N.E.A., Peichoto, M.C. & SOLÍS NEFFA, V.G. (2018). Variabilidad genética en poblaciones de *Elionurus muticus* (poaceae) de corrientes, argentina, a partir de marcadores moleculares de ADN nuclear y cloroplástico. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 53(2), 1-10.
 - Sára, M. & Sleytr, U.B. (2000). S-layer proteins. *Journal of bacteriology*, 182(4), 859-868.
 - Scenihhr (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf
 - Schell, H.L., Cumini, M.L., & Bujia D. (2011). Información de la Actividad Avícola en Entre Ríos 2010. Ministerio de producción, Gobierno de Entre Ríos. [https://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVICULTURA/INFO%20ACT%20AVICOLA%202010/Estadisticas_Avicultura_2010_final_2\(1\).pdf](https://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVICULTURA/INFO%20ACT%20AVICOLA%202010/Estadisticas_Avicultura_2010_final_2(1).pdf)
 - Scher, K., Römling, U. & Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air– liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1163-1168.
 - Schonewille, E., Windhorst, D. & Bräuni, I. (2012). Biofilm building properties of *Salmonella* on the poultry farm. *International Poultry Production*, 20, 13-15.
 - Schulz, J., Van Hoorebeke, S., Hald, B., Hartung, J., Van Immerseel, F., Radtke, I., Kabell, S., Dewulf, J. (2011). The dynamics of *Salmonella* occurrence in commercial laying hen flocks throughout a laying period. *Avian Pathol.*, 40, 243-248.
 - Scott, E. (1996). Foodborne diseases and other hygiene issues in the home. *Journal of Applied Microbiology*, 80, 5-9.
 - Scott, H.M., Acuff, G., Bergeron, G., Bourassa, M.W., Gill, J., Graham, D.W., Kahn, L.H., Morley, P.S., Salois, M.J., Simjee, S., Singer, R.S., Smith, T.C., Storrs, C. & Wittum, T.E. (2019). Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. *Ann N Y Acad Sci.*, 1441(1), 8-16.
 - Scramin S., Saito, M.L., Pott, A., Ortiz, M. & Mayo, M. (2000). Essential oil of *Elionurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). *JEOR*. 12, 298-300.
 - Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2022). Anuario Avícola. Año XXVII N° 85. Ministerio de Economía, Argentina. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/archivos/000001_Anuario%20Avicola%202022.pdf .
 - Secretaría de Agroindustria. 2018. Aves. Información estadística. <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/aves/estadistica/huevos/index.php>.
-

-
- Secretaría de Comunicación. Gobierno de Entre Ríos. (2020). La avicultura crece y genera 22.000 empleos en la provincia. <https://noticias.entrerios.gov.ar/notas/la-avicultura-crece-y-genera-22000-empleos-en-la-provincia.htm>
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2010). Resolución 542/2010. http://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVICULTURA/LEGISLACION/Res_senasa_542_10_1.pdf .
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2019). Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal (Sigsa), Dirección Nacional de Sanidad Animal. <https://www.senasa.gob.ar/tags/sigsa>
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2015). Res. 591/2015. Programa Nacional de Vigilancia de Resistencia a los antimicrobianos en los animales destinados a consumo humano. http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/res_591-2015.pdf .
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (2017). Establecimientos con Avicultura por Tipo de Producción. http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/INFORMES%20Y%20ESTADISTICAS/Informes%20y%20estadisticas%20Animal/AVES/INDICADORES%20GANADEROS/distribucion_de_granjas_avicolas_por_provincia_-_marzo_2017.xls .
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2016a). Resolución 86/2016. Programa de vigilancia y control de la contaminación por *Salmonella* spp. en granjas avícolas comerciales. http://www.cira.org.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=6600:resolucion-862016&catid=112&Itemid=500.
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2016b). Plan Nacional de Sanidad Avícola. Manual de Procedimientos operativos, Buenos Aires. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/1._manual_de_procedimientos_operativos_programa_de_control_de_micoplasmosis_y_salmonelosis_en_aves_reproductoras-res_senasa_ndeg_882.2002-version_2018.pdf
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2015. Relevamiento de granjas. http://www.senasa.gob.ar/prensa/DNSA/Control_Gestion_y_Programas_Especiales/Indicadores_ganaderos/6_Indicadores_Avicolas/Avicolas.html.
 - SENASA (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA). (2021). Resolución 153/2021. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-153-2021->
-

[348400/texto.](#)

- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2016). Resolución 86/2016-ministerio de agroindustria. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-86-2016-ministerio-de-agroindustria>
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2010. Resolución 542/2010. http://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVICULTURA/LEGISLACION/Res_senasa_542_10_1.pdf.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2019). Resolución 1699/2019. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-1699-2019-333207/texto>
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2019). Resolución 22/2019. Productos veterinarios: prohibición de elaboración, distribución, importación, uso y tenencia. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/200151/20190115>
- Seo, H.J. & Kang, S.S. (2020). Inhibitory effect of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* on the biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium. *Food Control*, 117, 107361.
- Seo, K.W., Kim, J.J., Mo, I.P. & Lee, Y.J. (2019). Molecular characteristic of antimicrobial resistance of *Salmonella* Gallinarum isolates from chickens in Korea, 2014 to 2018. *Poult. Sci.* 0, 1-8.
- Shange, N., Makasi, T., Gouws, P. & Hoffman, L.C. (2019). Preservation of previously frozen black wildebeest meat (*Connochaetes gnou*) using oregano (*Oreganum vulgare*) essential oil. *Meat Sci.*, 148, 88-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.012>
- Shapiro, H. (2008), Flow cytometry of bacterial membrane potential and permeability. *Methods in Molecular Medicine*, 142, 175-186.
- Sharma, D., Misba, L. & Khan, A.U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 8, 76. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S.D., Schwartz, S.A., Bruggemann, L. & Aalinkeel, R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*, 11, 1614.
- Sharma, V.K. & Carlson, S.A. (2000). Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment-broth culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5472-5476.
- Shen, Y., Stojicic, S., Qian, W., Olsen, I. & Haapasalo, M. (2010). The synergistic

antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *Journal of Endodontics*, 36, 100-104.

- Shi, X. & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Tech.*, 20(9), 407-413.
- Shivaprasad, H. L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19, 405-424.
- Shivaprasad, H.L. (2003). Pullorum disease and fowl typhoid. Páginas 568–582 en *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald y D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Shulaw, W.P. & Bowman, G.L (2001). Disinfection in on-farm biosecurity procedures. The Ohio State University Extension Fact Sheet VME-8-2001.
- Sik, B., Hanczné, E.L., Kapcsándi, V. & Ajtony, Z. (2020). Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLCDAD measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 184, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113173>
- Sik, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanczné, E.L. & Ajtony, Z. (2019). Recent Advances in the Analysis of Rosmarinic Acid From Herbs in the Lamiaceae Family. *Natural Product Communications*, 2019, 1-10.
- Silva, N., Alves, S., Gonçalves, A., Amaral, J. S. & Poeta, P. (2013). Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants Referencias bibliográficas 184 against several foodborne and spoilage bacteria. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 19(6), 503-510.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology*, 53(4), 1123-1134.
- Simoes, L.C., Simoes, M. & Vieira, M.J. (2010a). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(19), 6673-6679.
- Simoes, M., Pereira, M.O., Machado, I., Simões, L.C. & Vieira, M.J. (2006a). Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 741-774
- Simões, M., Simões L., Machado I., Pereira M. & Vieira M. (2006b). Control of flow-generated biofilms using surfactants – Evidence of resistance and recovery. *Food and*

Bioproducts Processing, 84, 338-345.

- Simões, M., Simões, L.C. & Vieira, M.J. (2010b). A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT-Food Science and Technology, 43(4), 573-583.
- Simons, A., Alhanout, K. & Duval, R.E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. Microorganisms, 8(5), 639.
- Singer, R.S., Mayer, A.E., Hanson, T.E. & Isaacson, R.E. (2009). Do microbial interactions and cultivation media decrease the accuracy of *Salmonella* surveillance systems and outbreak investigations? J. Food Prot., 72, 707-713.
- Singh, N., Sharma, C., Gulhane, R.D., Rokana, N., Singh, B.P., Puniya, A.K. & Panwar, H. (2018). Inhibitory effects of lactobacilli of goat's milk origin against growth and biofilm formation by pathogens: an in vitro study. Food bioscience, 22, 129-138.
- Singh, S., Yadav, A.S., Singh, S.M., Bharti, P. (2010). Prevalence of *Salmonella* in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. Food Res. Int., 43, 2017-2030.
- Sintim, H.O., Smith, J.A., Wang, J., Nakayama, S. & Yan, L. (2010). Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. Future medicinal chemistry, 2(6), 1005-1035.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. J. Agric. Food Chem., 44, 1202-1205.
- Skandamis, P. N. & Nychas, G.J.E. (2012). Quorum sensing in the context of food microbiology. Appl. Environ. Microbiol., 78(16), 5473-5482.
- Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K. & Nychas, G. (2001). Inhibition of *Oregano* essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Italian Journal of Food Science, 13(1), 65-75.
- Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D. & Schuster, B. (2001). Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. Progress in Surface Science, 68(7-8), 231-278.
- Sleytr, U.B., Huber, C., Ilk, N., Pum, D., Schuster, B. & Egelseer, E.M. (2007). S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. FEMS microbiology letters, 267(2), 131-144.
- Smith K. & Hunter I.S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J. Med. Microbiol., 57(Pt 8), 966-973.

-
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M. & Gamazo, C. (2002). Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3), 793-808.
 - Soria, M.A. & Bueno D.J. (2016). Culture based methods to detect *Salmonella* from different poultry products. Pages 57–86 in *Food Microbiology: Fundamentals, Challenges and Health Implications*, E. Perkins, ed., Nova Science Publishers, New York.
 - Soria, M.A., Godano, E.I., Leiva, L.E. & Bueno, D.J. (2023). Relationship of *Salmonella* isolation with different serum and inflammatory intestinal parameters in natural fowl typhoid outbreaks from laying hens. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 101, 102055.
 - Soria, M.A., Soria, M.C. & Bueno, D.J. (2012). A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction for *Salmonella* detection in egg content. *Poult. Sci.* 91, 2668–2676.
 - Soria, M.C. (2013). *Salmonella* y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales. Tesis doctorado, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
 - Soria, M.C., Soria, M.A. & Bueno D.J. (2012). Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poult. Sci.*, 91, 616-626.
 - Soria, M.C., Soria, M.A., Bueno, D.J. & Colazo, J.L. (2011). A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction assay for *Salmonella* detection in poultry feed. *Poult. Sci.*, 90, 2606-2618.
 - Soria, M.C., Soria, M.A., Bueno, D.J., Godano, E.I., Gómez, S.C., Vís Butron, I.A., Padin, V.M. & Rogé, A.D. (2017). *Salmonella* spp. contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. *Poult. Sci.*, 00, 1-11.
 - Srey, S., Jahid, I. & Ha, S. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
 - Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C. (2012). *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502-531.
 - Stefanovicová A., Reháková, H., Skarková, A., Rijpens, N. & Kuchta, T. (1998). Confirmation of presumptive colonies by the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1381-1383.
 - Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-179.
 - Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I. &
-

Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115, 891-899.

- Stephenson, P., Satchell, F.B., Allen, G. & Andrews, W.H. (1991). Recovery of *Salmonella* from shell eggs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74, 821-826.
- Stocki, S.L., Annett, C.B., Sibley, C.D., McLaws, M., Checkley, S.L. & Singh, N. (2007). Persistence of *Salmonella* on egg conveyor belts is dependent on the belt type but not on the rdar morphotype. *Poultry Science*, 86(11), 2375-2383.
- Stolker, A.A.M. & Brinkman, U.A.Th. (2005). Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. *J. Chromatog. A*, 1067, 15-53.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. & Costerton, J. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
- Suárez Alfonso, M.C., & Mantilla Anaya, J. R. (2000). Presencia de *Salmonella* serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *Iatreia*, 13(4), 237-245. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.3783>
- Sumintarti, S.N.F., Hajrah-yusuf, A.S., & Ruslin, M. (2018). Effects of rosemary (*rosmarinus officinalis* L.) Leaf extract on angular cheilitis induced by staphylococcus aureus and candida albicans in male wistar rats. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 10(1), 178-181. DOI: <https://doi.org/10.22159/ijap.2018.v10s1.39>
- Sykes, R.B. & Bonner, D.P. (1985). Discovery and development of the monobactams. *Clin. Infect. Dis.*, 7(4), S579-S593.
- Tabak, M., Scher, K., Chikindas, M. & Yaron, S. (2009). The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Microbiology Letters*, 301, 69-76.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Römling, U., Matthews, K. R. & Chikindas, M.L. (2007). Effect of triclosan on *Salmonella* Typhimurium at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2), 200-206.
- Taddei F., Radman, M., Maynard-Smith J., Toupance, B., Gouyon, P.H. & Godelle B. (1997). Role of mutator changes in adaptive evolution. *Nature*, 387, 700-702.
- Taddele, M.H., Rathore, R. & Dhama, K. (2012). Antibioassay of *Salmonella* Gallinarum and Other *Salmonella enterica* Serovars of Poultry Origin in India. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 7, 309-317.

-
- Talaro, K. P. & Chess, B. (2008). Foundations in microbiology. 8th Ed. McGraw Hill, New York.
 - Tan, M., White, A., Rahman, S. & Dykes, G. (2016). Role of Fimbriae, Flagella and Cellulose on the Attachment of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 to Plant Cell Wall Models. *PLoS One.*, 11., e0158311.
 - Tellez, G., Petrone, V.M., Escorcía, M., Morishita, T.Y., Cobb, C.W., Villaseñor, L. (2001). Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Heidelberg specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* Enteritidis in broilers. *J. Food Prot.*, 5, 287-291.
 - Terzolo, H. (2004). Salmonelosis en el hombre, las aves y su implicancia en microbiología de los alimentos. https://www.researchgate.net/publication/280804527_Salmonelosis_en_el_hombre_las_aves_y_su_implicancia_en_microbiologia_de_los_alimentos
 - Terzolo, H.R. (2011). Bacteriological study of avian salmonellosis (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) in Latin America. Seminario Internacional de Salmonelosis aviar
 - Thanner, S., Drissner, D. & Walsh, F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *ASM Journals, mBio.*, 7(2), e02227-15.
 - Thorrold, C.A., Letsoalo, M.E., Dus'e, A.G. & Marais, E. (2007). Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 113(3), 315-320.
 - Threlfall, E.J., Wain, J., Peters, T., Lane, C., De Pinna, E., Little, C.L. Wales, A.D. & Davies, R.H. (2014). Egg-borne infections of humans with *Salmonella*: not only an *S. Enteritidis* problem. *Worlds Poult. Sci. J.*, 70, 15-26.
 - Thrusfield, M. (1990). Epidemiología Veterinaria. Butetrwhorths & Co. (Eds). London WC2B6AB. 14: 191-205
 - Tiwari, R., Bharti, S., Kaur, R., Dikshit, R. & Hoondal, G. (2005). Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*, 122, 80-84.
 - Tkachenko, O., Shepard, J., Aris, V.M., Joy, A., Bello, A., Londono, I., Marku, J., Soteropoulos, P. & Peteroy-Kelly, M.A. (2007). Triclosan/ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. *Res. Microbiol.*, 158(8-9), 651-658.
 - Torres, J.A., Villegas, M.V. & Quinn, J.P. (2007). Current concepts in antibiotic-resistant

gram-negative bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 5,833-843.

- Torres, J.S., Sánchez, L. & González, L. (2016). Seroprevalencia de cepas de *Salmonella* spp. recuperadas en muestras de coprocultivos en pacientes pediátricos. *Presencia Bioquímica*, 305, 5-9.
- Toso, F., Mestorino, N. & Ardoino, S. (2023). Aceites esenciales como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. *Investigación Joven*, 10(3), 444–445. <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/15477>
- Tunes, M. & Vigo, G.B. (2007). *Salmonella*. Páginas 210-214 en *Microbiología Veterinaria*. N. O. Stanchi, P. E. Martino, E. Gentilini, E. H. Reinoso, M. G. Echeverría, N. A. Leardini y J. A. Copes eds. Inter Médica, Buenos Aires, Argentina.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A. & Smid, E.J. (2000). Adaptation of food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.*, 174, 233-238.
- Upmanyu, N. & Malviya, V.N. (2020). Antibiotics: Mechanisms of Action and Modern Challenges. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 367–382.
- USDA (United States Department of Agriculture). (2017). Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and catfish products and carcass and environmental sponges. <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/700c05fe-06a2-492a-a6e1-3357f7701f52/MLG-4.pdf?MOD=AJPERES>
- USDA, (2006). Biosecurity guide for poultry and birds owners.
- USDA. (2005). Distribution of *Salmonella* prevalence in hens and eggs. http://www.fsis.usda.gov/PDF/SE_Risk_Assess_Annex_B_Oct2005.pdf
- Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., & Neyts, K.D. (1998). Prevalence of *Salmonella* in poultry carcass and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 1-8.
- Vaara M. (1993). Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in Gramnegative enteric bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 354-356.
- Vaccari, L., Molaei, M., Niepa, T.H., Lee, D., Leheny, R.L. & Stebe, K.J. (2017). Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science*, 247, 561-572.
- Valentin-Bon, I.E., Brackett, R.E., Seo, K.H., Hammack, T.S. & Andrews, W.H. (2003). Preenrichment versus direct selective agar plating for the detection of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs. *Journal of Food Protection*, 66, 1670-1674.
- van Bunnik, B.A.D. & Woolhouse, M.E.J. (2007). Modelling the Impact of Curtailing

Antibiotic Usage in Food Animals on Antibiotic Resistance in Humans. R. Soc. Open Sci., 4 (4). DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.161067>

- Van den Driessche, F., Rigole, P., Brackman, G. & Coenye, T. (2014). Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 98, 31-34.
- Van Hoorebeke, S. (2010). The effect of different housing systems on *Salmonella* and antimicrobial resistance in laying hens. <https://pdfs.semanticscholar.org/58dc/6dc84a9378c5ee34352189f2d7a0b70bc580.pdf>
- Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Barco, L., Ricci, A., de Kruif, G. & Dewulf J. (2010). Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 94, 94-100.
- Van Schothorst, M. & Van Leusden, F.M. (1975). Comparison of several methods for the isolation of salmonellae from egg products. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 1041-1045.
- van Schothorst, M. & van Leusden, F.M. (1975). Further studies on the isolation of injured *Salmonellae* from foods. *Zentralbl. Bakteriol. OrigA*, 230, 186-191.
- Vandeplass, S., Dubois Dauphin, R., Beckers, Y., Thonart, P. & Thewis, A. (2010). *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *Journal of Food Protection*. 73, 774-785.
- Velge, P., Cloeckart, A. & Barrow, P. (2005). Emergence of *Salmonella* epidemics: The problem related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36, 267-288.
- Venturino, J. 2006. Bioseguridad en Granjas Avícolas. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/34-bioseguridad.pdf.
- Vestby, L.K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E. & Nesse, L.L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet. Res.*, 5, 20-26.
- Vidal, A.A. (1954). Estudio químico de una gramínea argentina "*Elionurus viridulus* Hackel". *Revista Fac. Agr.* 302, 167-180.
- Vidal, D.R., Ragot, C. & Thibault, F. (1997). Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Ann. Pharm. Fr.*, 55(2), 49-54.
- Villada, L.A.G. (2018). Aceites esenciales: un mercado potencial para el

aprovechamiento de la biodiversidad colombiana. *Ingeniería y Sociedad*, 13, 22-28.

- Viora, S., Anselmo, R., Barrios, H. & Franceschi, M.D. (1993). *Salmonella* Enteritidis en maples. *Rev. Med. Vet.* 74, 96-99.
- Vivian, R.C. (2014). The evaluation of biofilm formation and sensitivity to peracetic acid of *Salmonella* spp. isolated from poultry abattoir [dissertation]. São Paulo, Universidade Estadual Paulista.
- Vuthy, Y., Lay, K.S., Seiha, H., Kerleguer, A. & Aidara-Kane, A. (2017). Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* and among *Salmonella* subsp. in chicken food chains. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 7(7), 670-674.
- Wagner, K.H. & Elmadfa, I. (2003). Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metabol.*, 47(3-4), 95-106.
- Wagner, M. & Horn, H. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnology and Bioengineering*, 114, 1386-1402.
- Waltman, W.D. & Gast R.K. (2016). *Salmonella enterica*. Pages 103–112 in *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, S. M. Williams, L. Dufour-Zavala, M. W.
- Waltman, W.D. (2000). Methods for the cultural isolation of *Salmonella*. In C. Wray & A. Wray (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (pp. 355–372). Wallingford, UK: CABI Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1079/9780851992617.0000>
- Wang, H., Ding, S., Dong, Y., Ye, K., Xu, X. & Zhou, G. (2013). Biofilm formation of *Salmonella* serotypes in simulated meat processing environments and its relationship to cell characteristics. *Journal of food protection*, 76(10), 1784-1789.
- Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., & Zhou, G. (2016). Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 298-304.
- Wang, H., Ye, K., Wei, X., Cao, J., Xu, X. & Zhou, G. (2013). Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control*, 33, 378-384.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A. & Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International journal of biological macromolecules*, 74, 119-126.
- Warburton, D.W., Arling, V., Worobec, S., Mackenzie, J., Todd, E.C.D., Lacasse, P., Lamontagne, G., Plante, R., Shaw, S., Browen, B & Konkle, A. (1994). A comparison study of the EF-18 agar/Hydrophobic Grid Membrane Filter (HGMF) method and the Enzyme

Linked Antibody (ELA)/HGMF method to the HPB standard method in the isolation of *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology, 23(1), 89-98.

- Weiler, N., Orrego, M., Alvarez, M., Huber, C., Ortiz, F., Nuñez, L., Piris, L., Perez, J. (2017). Primeros resultados de la vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana de patógenos transmitidos por alimentos, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. en tres poblaciones distintas. Paraguay. 2011-2012. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud., 15(2), 64-72.
- Weiss-Muszkat, M., Shakh, D., Zhou, Y., Pinto, R., Belausov, E., Chapman, M.R., Sela S. (2010). Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55: H7, an atypical enteropathogenic strain. Appl. Environ. Microbiol., 76(5), 1545-1554.
- White, A., Gibson, D., Collinson, S., Banser, P. & Kay, W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Journal of bacteriology, 185, 5398-5407.
- White, A., Weljie, A., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R. & Vogel H. (2010). A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. PLoS ONE, 5, e11814.
- White, A.P. & Surette, M. G. (2006) Comparative genetics of the rdar morphotype in *Salmonella*. Journal of Bacteriology, 188, 8395–8406.
- White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W. & Surette, M. G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. Journal of Bacteriology, 188(9), 3219-3227.
- Wiederoder, M., Liu, N., Lefcourt, A., Kim, M. & Martin Lo, Y. (2013). Use of a portable hyperspectral imaging system for monitoring the efficacy of sanitation procedures produce processing plants. Journal of Food Engineering, 117, 217-226.
- Williams, J.E. (1981). Salmonellas in poultry feeds—A worldwide review. World's Poultry Science Journal, 37, 6-25.
- Williams, K.P., Gillespie, J.J., Sobral, B.W., Nordberg, E.K., Snyder, E.E., Shallom, J.M. & Dickerman, A.W. (2010). Phylogeny of gammaproteobacteria. J Bacteriol., 192(9), 2305-2315.
- Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Maker, G., Trengove, R.D. & O'Handley, R.M. (2010). Comparative susceptibility of *Salmonella* Typhimurium biofilms of different ages to disinfectants. Biofouling, 26(7), 859-864.
- Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Trengove, R.D. & O'Handley, R. M. (2010). Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium

biofilms to disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2222–2228.

- Woo, J. & Ahn, J. (2013). Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 56(4), 307-313.
- Wray, C. & Wray, A. (2000). *Salmonella* in domestic animals. Oxon, UK and New York: CABI Publishing 023-01290-4
- Wu, K.H., Wang, K.C., Lee, L.W., Huang, Y.N. & Yeh, K.S (2012). A constitutively mannose-sensitive agglutinating *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain, carrying a transposon in the fimbrial usher gene *stbC*, exhibits multidrug resistance and flagellated phenotypes. *Sci. World J.* 2012, 280264.
- Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L. & Deng Y. (2016). Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Current Microbiology*, 73, 474-482.
- Yang, S.J., Park, K.Y., Kim, S.H., No, K.M., Besser, T.E., Yoo, H.S., Kim, S.H., Lee, B.K., & Park, Y.H. (2002). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet. Microbiol.*, 86, 295-301.
- Yap, P., Yiap, B., Ping, H. & Lim, S. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8,6.
- Yasunaga, A, Yoshida, A., Morikawa, K., Maki, K., Nakamura, S., Soh, I., Awano, S. & Ansai, T. (2013). Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. *BioMed Central Microbiology*, 13, 157-166.
- Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Kawada, M., Oho, T. & Koga T. (2003). Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4438-4441.
- Yousef, A.E. & Carlstrom, C. (2006). *Salmonella*. En: *Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio*. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p:181-222.
- Yuño, M.M., Terzolo, H.R., Fernández, H.D., Malena, R.C. & Altuna, M.E. (1995). Evaluación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Salmonella* en producción avícola. *Revista Argentina de Microbiología*, 27, 57-69.
- Zahner, H. & Maas, W. (1972). *Biology of Antibiotics*. Springer-Verlag, New York.
- Zairi, A., Nour, S., Khalifa, M. A., Ouni, B., Haddad, H., Khelifa, A., Trabelsi, M. (2019).

Phytochemical analysis & Assessment of Biological Properties of essential oils obtained from Thyme & Rosmarinus Species. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 21, 414, 424. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1389201020666191019124630>.

- Zhao, A., Sun, J. & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 13,1137947.
- Ziech, R.E., Perin, A.P., Lampugnani, C., Sereno, M.J., Viana, C., Soares, V.M. & dos Santos Bersot, L. (2016). Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 85-90.
- Zimbro, M.J. Power, D.A. Miller, S.M. Wilson, G.E. & Johnson. J.A. (2009). Difco & BBL Manual: Manual of microbiological culture media. 2. ed. Sparks, MD: Becton, Dickinson.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 39(6), 1452-1463. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x>
- Zúñiga, C.I.R . & Caro L.J. (2022). Fármacos en alimentos: un riesgo potencial para resistencias permanentes. *Rev. Latin. Infect. Pediatr.*, 35 (1), 9-11. DOI: <https://dx.doi.org/10.35366/104659>
- Zurita, A.L., Montes, S.H., Rivas, R.M. & Moraga, B.L. (1989). Mastitis clínica II: Actividad *in vitro* de espiramicina, lincomicina y neomicina y efectividad *in vitro* de la asociación de estos antibióticos mas corticoide. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 11(2).