



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**“SALMONELLA Y AFLATOXINAS EN GRANJAS DE GALLINAS
PONEDORAS COMERCIALES”**

Lic. Soria María Cecilia

Director: Dr. Horacio Raúl Terzolo

Co-director: Dr. Dante Javier Bueno

Tesis propuesta para optar por el título de
Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas
de la Universidad Nacional de La Plata

Marzo de 2013

A mis padres, Marta y Oscar

A mi hermano Marcelo,

A Iván y Luana

A mis tías Cristina y Cecilia

Agradecimientos

A mis padres Marta y Oscar por todo su cariño, su dedicación, esfuerzo, comprensión y ejemplo de vida.

Al Dr. Horacio Raúl Terzolo, Director de este trabajo de Tesis por sus consejos y experiencia para guiar este camino.

Al Dr. Dante Javier Bueno, mi Co-Director de Tesis, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, su tiempo y conocimientos.

Al Dr. Patricio de Urza, asesor académico, por su constante predisposición para colaborar con el trabajo de esta Tesis.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), y a la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Concepción del Uruguay por abrir sus puertas para la realización de este estudio.

Al CONICET y al INTA, por financiar mi trabajo de posgrado.

A la Directora del Inst. Tecnología de Alimentos del INTA Castelar, Dra. Alejandra Ricca y al personal del Laboratorio de contaminantes Químicos y Biológicos: Dante, Alba y Susana por brindarme la posibilidad de trabajar en sus instalaciones.

A los Med. Vet. Eduardo Godano, Indira Via Butrón y Selva Via Butrón por su colaboración durante los muestreos de granjas.

Al la Dra Viviana Rougier (UTN Concepción del Uruguay), por sus aportes y tiempo dedicado a los modelos matemáticos de esta Tesis.

Al Dr. Omar Faure (UTN Concepción del Uruguay) y Dr. Marcelo Signorini (INTA Rafaela) por su ayuda en los análisis estadísticos.

Al Dr. Juan Trinidad, responsable del Laboratorio de Sanidad Aviar al momento de mi llegada a INTA, por permitirme realizar allí mi trabajo.

A todos mis compañeros de la EEA Concepción del Uruguay, en especial a Fran, Miriam, Corina, Jose Luis, Favio, Fede, Flor, Caro y Agus por acompañarme en esta etapa.

A mi hermano Marcelo, por darme las dos ternuras de mi vida: Iván y Luana.

A mi amigo y compañero de trabajo Mario Alberto Soria, por estar conmigo en todo momento, por brindarme su cariño y sobre todo como dice su tocayo Benedetti, por defender la alegría como una bandera.

A mis amigos Amalia Mangia y Gonzalo Rodriguez por compartir conmigo toda esta etapa, por escucharme siempre y darme su amistad.

A mis amigas Mabel Taljuk y Carolina Espeche por su calidez humana, su constante aliento para poder seguir adelante.

A mis tías y tíos, y a todos los que no están pero perduran el corazón.

A Martín Adrián Marín por su amor, su compañía en momentos difíciles, por elegir estar cada día a mi lado.

A Graciela, Julio y Laura, por hacerme sentir en familia y su ayuda constante.

A mis amigos de Concepción del Uruguay: Aldo, Viviana, Julio, Pitu, Seba y Aníbal por cada momento compartido.

A mi amiga María Jose Vildoza, por estar siempre a pesar de la distancia.

A mis amigas Alejandra Córdoba y Sole Espeche, por su música.

Producción Científica

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

Revistas internacionales con referato

Soria, M. C., M. A. Soria, D. J. Bueno y J. L. Colazo. 2011. A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction assay for *Salmonella* detection in poultry feed. Poultry Science 90:2606-2618.

Soria, M. C., M. A. Soria y D. J. Bueno. 2012. Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. Poultry Science 91:616-626.

Soria, M. C., M. A. Soria y D. J. Bueno. 2013. A comparative study of culture methods and PCR assay for *Salmonella* detection in poultry drinking water. Poultry Science 92:225-232.

Revistas nacionales e internacionales de divulgación

Soria, M.C., D.J, Bueno, 2009. Contaminación con *Salmonella* del alimento para aves. CAPIA Informa 235: 51-52.

Soria, M.C., D.J, Bueno. 2011. Importancia de *Salmonella* en aves de postura. CAPIA Informa 46.

Soria, M.C., Bueno, D.J. 2011. *Salmonella* y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales. Portal Veterinaria albéitar 09/2011.

<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/9734/>

Publicación de capítulo de libro

D. J. Bueno, **M. C. Soria.**, H. H L. González, D. A. Sampietro, F. J. Federico y J. O.Silva. Fungi and mycotoxins in food. 2011. Multidisciplinary Approaches on Food Science and Nutrition for the XXI Century. R. Filip ed.

Comunicaciones a congresos científicos de la especialidad**Congresos nacionales**

Soria, M.C., V. Rougier y D.J. Bueno. XIV Jornadas Argentinas de Microbiología. “Aplicación de un modelo no lineal para curvas de inactivación térmica de *Salmonella* sp.” Chaco, Argentina. 29 al 01 de octubre de 2011.

Soria, M.C., M.A Soria y D.J. Bueno. XII Congreso Argentino de Microbiología. “Comparación de dos técnicas bacteriológicas y PCR para la detección de *Salmonella* spp. en agua de bebida para aves de corral”. Capital Federal, Argentina, 17 al 20 de Octubre de 2010

Soria, M.A., **M.C, Soria** y D.J. Bueno. XII Congreso Argentino de Microbiología,. “Detección de *Salmonella* por técnicas de aislamiento y PCR en pool de clara y yema contaminadas artificialmente”. Capital Federal, Argentina, 17 al 20 de Octubre de 2010.

Soria, M.C., M.A Soria y D.J. Bueno. Sensibilidad a distintos antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella* spp. provenientes de casos clínicos e ingredientes de alimentos para aves. XVII Reunión Científica Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Santa Fe, Argentina. 29 al 31 de Octubre de 2008.

Congresos Internacionales

Soria, M. C., M.A Soria, D.J. Bueno, E.I. Godano, S.C. Gómez E I.A. Vía Butrón. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. Presencia de *Salmonella* sp. en huevos y ambiente de granjas de aves ponedoras de la provincia de Entre Ríos. 26 al 29 de noviembre de 2012

Soria, M. C., M.A Soria, D.J. Bueno y H.R. Terzolo. XXIV World’s Poultry Congress. Comparison of three culture methods combined with PCR assays for the detection of non-motile *Salmonella* strains in poultry feed. Bahía, Brasil, 5 al 9 de agosto de 2012

Bueno, D.J., **M.C Soria.**, M.A Soria. E I.A Vía Butron. XXIV World’s Poultry Congress. A comparative study of different methods for the detection of *Salmonella* in poultry feed. Bahía, Brasil, 5 al 9 de agosto de 2012.

Soria, M.C.; M.A Soria, J. Colazo, D.J Bueno. Comparison of Two Cultures Methods and PCR for *Salmonella* sp Detection in Poultry Feed. XIIIth European Poultry Conference, Tours, Francia. 23 al 27 de Agosto de 2010.

SORIA, M. C.; M.A SORIA, D.J. BUENO. Evaluación de cuatro medios de cultivo para el aislamiento de *Salmonella spp.* en alimento de aves ponedoras. 6^{tas} Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 14 y 15 de Agosto de 2009.

INDICE GENERAL

Resumen	2
Summary	4
Capítulo 1 Introducción General	6
1.1. Producción de huevo para consumo	7
1.2. Aves de postura y sistemas de producción	10
1.3. Producción de huevos e inocuidad alimentaria.	11
1.4. Género <i>Salmonella</i>	12
1.4.1. Nomenclatura y taxonomía	13
1.1.2. Especificidad de hospedador para la infecciones por <i>Salmonella</i>	14
1.4.4. Salmonelosis en <i>Gallus gallus</i>	16
1.4.4.1. Pullorosis y Tifosis aviar	17
1.4.4.2. Paratifosis aviar	20
1.4.4.3. Patogenia de la infección en la salmonelosis aviar	23
1.5. Formación del huevo e infección con Salmonelas	24
1.5.1. Contaminación del huevo antes de la oviposición.	26
1.5.2 Contaminación del huevo después de la oviposición	28
1.6. Detección de <i>Salmonella</i> en el laboratorio a partir de muestras avícolas	29
1.6.1. Método de cultivo bacteriológico	30
1.6.1. Medios de cultivo para pre-enriquecimiento	31
1.6.1.4. Medios de cultivo para enriquecimiento selectivo	32
1.6.1.5. Agares selectivos-diferenciales.	33
1.6.1.6. Confirmación de género: pruebas bioquímicas	36
1.6.1.7. Serotipificación: confirmación serológica	38
1.6.2. Métodos rápidos	39
1.6.3. Métodos serológicos	41
1.7. Bioseguridad e identificación de factores de riesgo	41
1.8. Micotoxinas	44
1.8.1. Micotoxinas en avicultura	45
1.8.2. Aflatoxicosis y producción avícola	49
1.8.3. Aflatoxinas y su implicancia en salud humana	51
1.8.5. Regulación de micotoxinas en los alimentos	55
Hipótesis y Objetivos	60
Capítulo 2 Detección de <i>Salmonella</i> sp. en alimento, agua de bebida y excretas de aves de corral.	61
2.1 Materiales y métodos	65
2.1.1. Cepas de <i>Salmonella</i> empleadas en los ensayos de inoculación	65
2.1.2. Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación	66
2.1.3. Sección I. Detección de <i>Salmonella</i> en alimento.	67
2.1.3.1. Determinación de la temperatura y tiempo de exposición. Aplicación de un modelo matemático de ajuste.	67
2.1.3.1.1. Elección de la temperatura de exposición.	67
2.1.3.1.2. Determinación del tiempo de exposición.	68
2.1.3.1.3. Curvas de inactivación (supervivencia) celular	68
2.1.3.2. Ensayos de inoculación de salmonelas en alimento de aves	69

2.1.3.2.1. Preparación de los inóculos de <i>Salmonella</i> en muestras de alimento para aves	69
2.1.3.2.2. Recuperación de las cepas de <i>Salmonella</i> a partir de las muestras de alimento inoculadas.	70
2.1.3.2.3. Confirmación de las cepas inoculadas.	71
2.1.3.2.4. Extracción de ADN	71
2.1.3.2.5. Ensayo de PCR	71
2.1.4. Sección II. Detección de <i>Salmonella</i> en agua de bebida de aves de corral.	72
2.1.4.1. Preparación de los inóculos de <i>Salmonella</i> en muestras de agua de bebida.	72
2.1.4.2. Recuperación de las cepas de <i>Salmonella</i> a partir de las muestras de agua inoculadas.	72
2.1.4.3. Extracción de ADN y ensayo de PCR	73
2.1.5. Sección III. Detección de <i>Salmonella</i> en excreta de aves.	73
2.1.5.1. Preparación de los inóculos de <i>Salmonella</i> en muestras de excreta de aves	73
2.1.5.2. Recuperación de las cepas de <i>Salmonella</i> a partir de las muestras de excreta inoculadas.	75
2.1.5.3. Extracción de ADN y ensayo de PCR	75
2.1.6. Criterios de capacidad discriminatoria y límite de detección de las técnicas	76
2.1.7. Análisis estadístico	77
2.2 Resultados	78
2.2.1. Sección I. Detección de <i>Salmonella</i> en alimento.	78
2.2.1.1. Determinación de temperatura y tiempo de exposición y modelo matemático de ajuste.	78
2.2.1.1.1. Elección de la temperatura de exposición	78
2.1.7. Análisis estadístico	78
2.2 Resultados	78
2.2.1.1.2. Elección del tiempo de exposición para cada cepa bacteriana.	79
2.2.1.1.3. Curvas de inactivación celular	83
2.2.1.2. Ensayos de inoculación de salmonelas en alimento de aves	85
2.2.1.2.1. Daño bacteriano en agar MacConckey y Verde Brillante	85
2.2.1.2.2. Recuento de microorganismos en alimento de aves	85
2.2.1.2.3. Capacidad discriminatoria de las técnicas	85
2.2.1.2. Ensayos de inoculación de salmonelas en alimento de aves	85
2.2.2. Sección II. Detección de <i>Salmonella</i> en agua de bebida de aves de corral.	95
2.2.3. Sección III. Detección de <i>Salmonella</i> en excreta de aves de corral.	102
2. 3. Discusión	111
2.3.1. Sección I. Detección de <i>Salmonella</i> en alimento.	111
2.3.2. Sección I. Detección de <i>Salmonella</i> en agua de bebida de aves de corral.	115
2.3.3. Sección III. Detección de <i>Salmonella</i> en excretas de aves de corral.	116
2.4. Conclusiones	117
Capítulo 3 Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.	119
3.1 Materiales y métodos	121
3.1.1 Criterios para la selección de las granjas.	121
3.1.3 Criterio del muestreo	123
3.1.4. Tipos de muestras	126
3.1.3. Procesamiento y análisis de las muestras	129

3.1.3.1 Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	129
3.3.1.2. Serotipificación	131
3.1.3.3 Detección de <i>Salmonella</i> sp. en suero.	132
3.1.3.4. Extracción de ADN	132
3.1.3.5. Ensayos de PCR	133
3.1.3.5.1. PCR para <i>Salmonella</i> sp.	133
3.1.3.5.2. PCR para <i>Salmonella</i> Enteritidis	133
3.1.3.5.3. PCR múltiple para la detección de <i>Salmonella</i> Typhimurium	133
3.1.3.5.3. PCR múltiple para la detección de <i>S. Gallinarum</i> y <i>S. Pullorum</i>	134
3.1.4. Estudio de capacidad discriminativa y concordancia	134
3.2 Resultados	135
3.4 Discusión	145
3.5. Conclusiones	150
Capítulo 4. Determinación de aflatoxinas en clara y yema de huevos de granjas de gallinas ponedoras.	152
4.1 Materiales y métodos	155
4.1.1 Reactivos	155
4.1.2 Protocolo para la extracción de aflatoxinas a partir de clara ó yema de huevo utilizando una metodología basada en QuEChERs.	155
4.1.3 Análisis cromatográfico	156
4.1.4. Parámetros evaluados de la técnica	157
4.1.5. Análisis de aflatoxinas en muestras de clara y yema de huevos de granjas de gallinas ponedoras.	158
4.2. Resultados	158
4.3. Discusión	170
4.4. Conclusiones	173
Capítulo 5. Identificación de factores de riesgo para <i>Salmonella</i> sp. en gallinas ponedoras y aflatoxinas en huevos de granjas avícolas de Entre Ríos.	174
5.1. Materiales y métodos	176
5.1.1. Selección de las unidades muestrales	176
5.1.2. Diseño del cuestionario	176
5.2. Resultados	179
5.3. Discusión	184
5.4. Conclusiones	189
Discusión General	190
Conclusiones Finales	196
Proyecciones	198
Referencias Bibliográficas	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Nomenclatura del género <i>Salmonella</i> (Su y Chiu., 2007).	13
Tabla 1.2. Ocurrencia geográfica de las micotoxinas.	45
Tabla 1.3. Contenidos máximos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de aflatoxinas en alimentos, según lo propuesto por la Comunidad Europea (la CE N° 165/2010).	56
Tabla 2.1. Cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas en los ensayos de inoculación.	65
Tabla 2.2. Porcentajes de daño celular para las tres temperaturas ensayadas a los diferentes tiempos de tratamiento para la cepa <i>S. Typhimurium</i> 06/11, según los conteos de bacterias en agar Mac Conkey (MC) y agar Verde Brillante (VB). Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.	80
Tabla 2.3. Porcentajes de daño celular en agar Mac Conkey (MC) y agar verde brillante (VB) para las cepas de <i>Salmonella</i> expuestas a 60°C. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.	81
Tabla 2.4. Valores de tiempo para la primera reducción decimal (δ), parámetro de forma (P), suma de cuadrado de errores (SCE), y R^2 para el ajuste de las curvas de inactivación. Para el caso de δ , los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.	83
Tabla 2.5. Daño bacteriano (%) para cada cepa de <i>Salmonella</i> en agar Mac Conkey (MC) y Verde Brillante (VB) antes de su inoculación en alimento balanceado de aves. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.	85
Tabla 2.6. Sensibilidad (Se) y Precisión (Pre) de los métodos tetrionato (TT-alimento), Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para cada serotipo (móviles e inmóviles) de <i>Salmonella</i> en alimento para aves contaminado artificialmente. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro.	87
Tabla 2.7. Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para cada cepa (móvil e inmóvil) de <i>Salmonella</i> inoculada en alimento contaminado artificialmente, de acuerdo a los métodos tetrionato (TT-alimento), Rappaport-Vassiliadis semosólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro.	88

Tabla 2.8. Resultados obtenidos al inocular serotipos móviles de *Salmonella* en alimento para aves y posterior aislamiento mediante los métodos tetrionato (TT-alimento), Rappaport-Vassiliadis semosólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 89

Tabla 2.9. Resultados obtenidos al inocular serotipos inmóviles de *Salmonella* en alimento para aves y posterior aislamiento mediante las técnicas tetrionato (TT-alimento) Rappaport-Vassiliadis semosólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 90

Tabla 2.10. Sensibilidad (Se) y precisión (Pre) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) en las cepas móviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro. 91

Tabla 2.11. Sensibilidad (Se) y precisión (Pre) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) en las cepas inmóviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro. 92

Tabla 2.12. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) en las cepas móviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro. 93

Tabla 2.13. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) en las cepas inmóviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro. 94

- Tabla 2.14.** Coeficiente de concordancia (Kappa) entre los métodos MSRV-alimento, TT-alimento y PCR en muestras de alimento. 95
- Tabla 2.15.** Sensibilidad y precisión de los métodos Tetrionato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos del cultivo de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada doble concentración (APTdc- PCR) para cada cepa móvil e inmóvil de *Salmonella* en muestras de agua contaminada artificialmente. Valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %. 97
- Tabla 2.16.** Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) de los métodos Tetrionato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos del cultivo de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada doble concentración (APTdc- PCR) para cada cepa móvil e inmóvil de *Salmonella* en muestras de agua contaminada artificialmente. Valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %. 98
- Tabla 2.17.** Resultados obtenidos al inocular serotipos *Salmonella* en muestras de agua de bebida para aves y posterior detección mediante las técnicas Tetrionato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) y Reacción en Cadena de la Polimerasa con templados obtenidos desde cultivo de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada doble concentración (APTdc-PCR) Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 99
- Tabla 2.18** Sensibilidad y precisión para los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-agua) y Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) para las cepas de *Salmonella* inoculadas en agua de bebida para aves. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 100
- Tabla 2.19.** Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios de cultivo agarizados en los métodos tetrionato (TT-agua) y Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) para las cepas de *Salmonella* inoculadas en agua de bebida para aves. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 101
- Tabla 2.20.** Coeficientes Kappa mostrando grado de concordancia entre todos los 102

métodos estudiados para la detección de *Salmonella* en agua de bebida.

Tabla 2.21. Sensibilidad, precisión, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de los métodos Tetratonato (TT-excreta), Rappaport Vassiliadis Semisólido modificado (MSRV-excreta) y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para cada serotipo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en excreta de aves contaminada artificialmente. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro indicado. 104

Tabla 2.22. Sensibilidad, precisión y especificidad para las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetratonato (TT-PCR) para cada cepa de *Salmonella* inoculada en muestras de excreta de aves. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %. 105

Tabla 2.23. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetratonato (TT-PCR) para cada cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inoculada en muestras de excreta de aves. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %. 106

Tabla 2.24. Resultados obtenidos al inocular distintos serotipos de *Salmonella* en excreta de aves y posterior detección mediante las técnicas Tetratonato (TT-excreta), Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-excreta), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetratonato (TT-PCR) Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 107

Tabla 2.25. Sensibilidad y precisión para los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetratonato (TT-excreta) y Rappaport-Vassiliadis Semisólido (MSRV-excreta) para las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inoculadas en excreta de aves ponedoras. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). 108

Tabla 2.26. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales mediante las técnicas tetrionato (TT-excreta) y Rappaport-Vassiliadis Semisólido modificado (MSRV-excreta) para las cepas de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> inoculadas en excreta de aves ponedoras. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de incubación (TT1° y TT2°, respectivamente).	109
Tabla 2.27. Coeficientes Kappa mostrando grado de concordancia entre todos los métodos estudiados.	110
Tabla 3.1. Número total de granjas de gallinas de postura en la provincia de Entre Ríos según categorización por nivel de bioseguridad de SENASA (A, B ó C) y número de granjas muestreadas por departamento.	122
Tabla 3.2. Número total, ubicación y características de los galpones muestreados.	125
Tabla 3.3. Porcentaje de muestras positivas a <i>Salmonella</i> por aislamiento y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), según tipo de muestra.	135
Tabla 3.4. Resultados obtenidos por aislamiento (Ais) y detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de <i>Salmonella</i> sp. en muestras de alimento, excreta, hisopados de arrastre, agua y huevo provenientes de granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.	137
Tabla 3.5. Resultados de la aglutinación rápida en placa con sueros y de los aislamientos y detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de <i>Salmonella</i> sp. obtenidos a partir de hisopados cloacales y órganos de gallinas ponedoras.	139
Tabla 3.6. Sensibilidad y Precisión relativas para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF18, MacConkey (MC) y <i>Salmonella-Shigella</i> (SS) utilizados en las distintas muestras de granjas.	141
Tabla 3.7. Concordancia entre los medios agarizados selectivos-diferenciales utilizados para la detección de <i>Salmonella</i> sp. en los distintos tipos de muestras.	142
Tabla 3.8. Concordancia entre los métodos tetrionato- alimento (TT-alimento), Reacción en Cadena de la Polimerasa-alimento (PCR), Rappaport- Vassiliadis semisólido modificado en excreta (MSRV-excreta) y PCR a partir de MSRV (MSRV-PCR) utilizados para la detección de <i>Salmonella</i> sp. en los distintos tipos de muestras.	143

- Tabla 3.9.** Resultados de la serotipificación y PCR para los aislamientos obtenidos de granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos. S= *Salmonella* sp., SE= *S. Enteritidis*, SG= *S. Gallinarum*, S.P=*S. Pullorum*, NoSE= no *S. Enteritidis*, NR= no realizado. 144
- Tabla 4.1.** Curvas de calibración y coeficientes de correlación en extractos de las muestras de clara de huevo fortificadas con 5 niveles distintos de aflatoxinas, desde 0,4 a 50,4 µg/kg para las AFB₁ y AFG₁ y de 1,7 a 71,3 µg/kg para las para las AFB₂ y AFG₂. 159
- Tabla 4.2.** Valores de recuperación (%R), desvío estándar relativo (DER%), DER calculados como 2/3 de los valores de la ecuación de Horwitz -2/3 DER (%) Horwitz-, límite del blanco (LB), y límite de detección (LD) obtenidos para 6 g de muestras de clara de huevo fortificadas con distintos niveles de aflatoxinas. Los valores de recuperación expresan el promedio de 3 mediciones. 160
- Tabla 4.3.** Desvío estándar relativo (DER%), DER calculados como 2/3 de los valores de la ecuación de Horwitz -2/3 DER (%) Horwitz-, límite del blanco (LB) y límite de detección (LD) obtenidos para 6 g de muestras de yema de huevo fortificadas con distintos niveles de aflatoxinas. 161
- Tabla 4.4.** Curvas de calibración y coeficientes de correlación en las muestras de clara ó yema de huevo fortificadas con 5 niveles distintos de aflatoxinas, desde 0,5 a 10 µg/kg para las AFB₁ y AFG₁ y de 0,1 a 2,5 µg/kg para las para las AFB₂. La ecuación se tomó para el cálculo del límite del blanco y límite de detección. 162
- Tabla 5.1.** Encuesta realizada en las 30 granjas de gallinas de postura muestreadas en la provincia de Entre Ríos. 177
- Tabla 5.2.** Resultados generales de la encuesta realizada en las 30 granjas muestreadas relativo al conocimiento de las reglamentaciones existentes, aspectos de bioseguridad y antecedentes de enfermedad. Se indica el número de granjas con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario para granjas positivas y negativas al aislamiento de *Salmonella* sp. 181
- Tabla 5.3.** Resultados generales de la encuesta realizada en las 30 granjas muestreadas relativo aspectos del alimento, agua y huevo. Se indican cada una de las preguntas del cuestionario para la totalidad de las granjas, granjas positivas y negativas al aislamiento de *Salmonella* sp. 182

- Tabla 5.4.** Resultados del análisis univariado para la identificación de los factores de riesgo para la presencia de *Salmonella* sp. en los 40 galpones de las 30 granjas de gallinas de postura muestreadas. 183
- Tabla 5.5.** Resultado del análisis multivariado para la identificación de los factores de riesgo ($P < 0,05$) para la presencia de *Salmonella* sp. en los galpones de las granjas muestreadas. 184

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales productores de huevo en América y toneladas producidas desde 2000 a 2012 (Anónimo, 2012).	8
Figura 1.2. Esquema de la cadena de ovoproductos y huevo fresco (COFECYT, 2008).	9
Figura 1.3. Partes del aparato reproductor de la gallina (A) y estructura del huevo (B) (Jonchère <i>et al.</i> , 2010).	25
Figura 1.4. Aspecto de colonias de <i>Salmonella</i> sp. en diferentes medios agarizados selectivos-diferenciales. A: agar verde brillante. B: agar Mac Conkey. C: Agar EF-18. D: agar XLD.	34
Figura 1.5. Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> de tipo móvil. A: agar hierro tres azúcares. B: agar lisina hierro. C: agar citrato de Simmons. D: medio Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM). E y F: agar Tartrato de Jordans, con <i>S. Enteritidis</i> y control sin sembrar, respectivamente. Los medios G y H corresponden a agar fenilalanina sembrados con <i>S. Enteritidis</i> (G) y <i>Pseudomonas</i> sp (H).	37
Figura 1.6. Algunas de las medidas de bioseguridad para granjas de producción avícola.	42
Figura 1.7. Estructura química de la aflatoxina B ₁ (Bennet y Klich, 2003).	46
Figura 1.8. Estructura química de la ocratoxina A. Fuente: Bennet y Klich, 2003.	47
Figura 1.9. Estructura química de la zearalenona (Bennet y Klich, 2003).	48
Figura 1.10. Estructura química de la citrinina (Bennet y Klich, 2003).	48
Figura 1.11. Estructura química de la fumonisina B ₁ (Bennet y Klich, 2003)	49
Figura 2.1 Flujograma del ensayo de selección de temperatura con la cepa de <i>S. Typhimurium</i> 06/11.	69
Figura 2.2. Flujograma para la detección de <i>Salmonella</i> en alimento balanceado para aves, mediante los métodos TT, MSRV y PCR. CTS-Fe= caldo tripteína de soja adicionado con sulfato de hierro II; TT1°= un día de incubación en caldo tetrionato; TT2°= 6 días de incubación en caldo tetrionato; VB= agar verde brillante; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato adicionado con tergitol 4; MC= agar MacConkey; EF-18 = agar EF-18.	70
Figura 2.3. Flujograma para la detección de <i>Salmonella</i> en agua de bebida para aves de corral, mediante los métodos tetrionato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR-agua) con templados a partir de cultivo en agua peptona tamponada (APT-PCR).	73

APT-dc- Agua peptona tamponada doble concentración; TT1°= un día de incubación en caldo TT; TT2°= 6 días de incubación en caldo TT; XLD= agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄= XLD adicionado con tergitol 4.

Figura 2.4. Flujograma para la detección de *Salmonella* en excreta de aves, mediante los métodos tetratrionato (TT), Rappaport –Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) y agua de peptona tamponada (APT)- PCR. TT1°= un día de incubación en caldo TT; TT2°= 6 días de incubación en caldo TT; XLD= agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄=agar XLD adicionado con tergitol 4. EF-18 = agar EF-18. 76

Figura 2.5. Inactivación de *S. Typhimurium* 06/11 para las tres temperaturas ensayadas (50, 55 y 60°C). N= número de células en un determinado tiempo. N₀= número inicial de células bacterianas. 79

Figura 2.6. Inactivación de las cinco cepas de *Salmonella* expuestas a 60°C durante 10 minutos. 82

Figura 2.7. Ajuste de la curvas de inactivación de 6 cepas de *Salmonella* al modelo $\log N/N_0 = -(t/\delta)^P$; donde N es el número de células sobrevivientes en un tiempo t, N₀ el número inicial de bacterias, δ representa el tiempo de la primera reducción decimal, y P es el parámetro de forma. (♦) valores experimentales; (—) valores teóricos. 84

Figura 3.1. Esquema de un galpón y lugares de toma de muestra. A: vista frontal; B: vista superior. F1, F2, F3 y F4: filas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. 124

Figura 3.2. Muestreo ambiental con placas de agar MacConkey (MC). 127

Figura 3.3. Esquema de la toma de muestras de hisopados de arrastre. A y B: cofias estériles embebidas en solución fisiológica. C: colocación de la cofia en la bota. D: caminata por uno de los laterales del galpón. E: se representa por líneas punteadas el trayecto realizado en cada lateral. 128

Figura 4.1 Protocolo de extracción para 6 g de clara (A) y yema (B). 156

Figura 4.3. Esquema para el procesamiento de las muestras de huevo procedentes de granjas de gallinas ponedoras de Entre Ríos. 159

Figura 4.4. Cromatograma de 6g de muestra de clara sin fortificar. 162

Figura 4.5. Cromatograma de muestra de clara fortificada con 0,5 µg/kg de AFB₁, 0,1 µg/kg de AFB₂ y 0,5 de AFG₁ µg/kg. 163

Figura 4.6. Cromatograma de muestra de clara fortificada con 1 µg/kg de AFB₁, 0,2 µg/kg de AFB₂ y 1 µg/kg de AFG₁. 164

Figura 6.7. Cromatograma de muestra de clara fortificada con 2 µg/kg de AFB ₁ , 0,5 µg/kg de AFB ₂ y 2 µg/kg de AFG ₁ .	164
Figura 4.8. Cromatograma de 6g muestra de yema sin fortificar.	165
Figura 4.9. Cromatograma de muestra de yema fortificada con 0,5 µg/kg de AFB ₁ , 0,1 µg/kg de AFB ₂ y 0,5 de AFG ₁ µg/kg.	165
Figura 4.10. Cromatograma de muestra de yema fortificada con 1 µg/kg de AFB ₁ , 0,2 µg/kg de AFB ₂ y 1 µg/kg de AFG ₁ .	165
Figura 4.11. Cromatograma de muestra de yema fortificada con 2 µg/kg de AFB ₁ , 0,5 µg/kg de AFB ₂ y 2 µg/kg de AFG ₁ .	166
Figura 4.12. Curva de calibración para aflatoxina B ₁ en clara de huevo.	166
Figura 4.13. Curva de calibración para aflatoxina B ₂ en clara de huevo.	167
Figura 4.14. Curva de calibración para aflatoxina G ₁ en clara de huevo.	167
Figura 4.15. Curva de calibración para aflatoxina B ₁ en yema de huevo.	168
Figura 4.16. Curva de calibración para aflatoxina G ₁ en yema de huevo.	168
Figura 4.17. Curva de calibración para aflatoxina G ₁ en yema de huevo.	169
Figura 4.18. Cromatograma de muestra de clara de huevo de granja de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.	169
Figura 4.19. Cromatograma de una muestra de yema de huevo de granja de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.	170
Figura 5.1. Certificado entregado a cada una de las 30 granjas luego de la visita.	178

ABREVIATURAS

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AGC	Agencia Gubernamental de Control de la ciudad de Buenos Aires
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	Asociación Americana de Salud Pública
APT	Agua de peptona tamponada
ATCC	American Type Culture Collection
CDC,	Center for Disease Control and Prevention
CE	Comunidad Europea
CTS	Caldo tripteína de soja
CUB	Concepción del Uruguay Bacteriología
DER	Desvío estándar relativo
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EFSA	European Food Safety Authority
Esp	Especificidad
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drugs Administration
HPLC	High Pressure Liquid chromatography
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISO	Organización Internacional de Estandarización
LB	Límite del blanco
LD	Límite de detección
LIA	Agar lisina hierro
MC	Agar Mac Conkey
MSRV	Medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado
OR	Razón de probabilidades
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pre	Precisión
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
Se	Sensibilidad
SENASA	Servicio Nacional de sanidad animal
SIM	Agar sulfuro-indol-movilidad
SS	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
TSI	Agar hierro tres azúcares
TT	Caldo tetratoato
USDA	United States Department of Agriculture
VB	Agar verde brillante
VPP	Valor predictivo positivo
VVN	Valor predictivo negativo
XLD	Agar -desoxicolato
XLT ₄	Agar Xilosa-lisina-tergitol

Resumen/Summary

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de bacterias del género *Salmonella* en granjas de gallinas ponedoras comerciales de la provincia de Entre Ríos, como así también la presencia de aflatoxinas en los huevos producidos en estos establecimientos. Además, se evaluaron los factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* y/o aflatoxinas. Se evaluaron metodologías de aislamiento bacteriológico y técnicas de PCR para la detección de *Salmonella* sp. en alimento, excretas y agua de bebida de aves de corral, a través de muestras obtenidas de cada una de estas matrices artificialmente contaminadas con serotipos móviles de *Salmonella entérica* subsp. *enterica* y las biovariedades inmóviles de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. En cada una de las matrices se evaluó la capacidad discriminatoria de las técnicas y su límite de detección, analizándose los datos mediante las pruebas de ANOVA y de hipótesis de proporciones. Por su parte, para la evaluación de aflatoxinas en huevo se empleó una metodología basada en QuEChERS (acrónimo del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), evaluándose la linealidad, exactitud, precisión, límite del blanco, límites de detección y cuantificación. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado en 30 granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos, tomando muestras ambientales (excreta, alimento, agua de bebida, aire, hisopados de arrastre y huevo) y de origen animal (órganos, hisopados cloacales y sangre). Para el muestreo se tuvo en cuenta la distribución de granjas en la provincia y la categoría de bioseguridad de las mismas, en base a las recomendaciones del SENASA. Se consideró como contaminada a aquella granja en la que al menos en una de las muestras examinadas hubiera sido aislada *Salmonella* sp. Por otro lado, para el análisis de los factores de riesgo se registraron los datos de una encuesta realizada con preguntas cerradas y abiertas, basadas en el registro de la aplicación de las medidas de bioseguridad en los establecimientos avícolas, según lo dispuesto por la reglamentación del SENASA 542/2010. Para el análisis de estos datos se aplicó un modelo de regresión logística y se determinó el cociente de probabilidades (OR). Las metodologías de aislamiento de *Salmonella* en alimento, excretas y agua de bebida mostraron diferencias significativas en su capacidad discriminatoria entre los serotipos móviles y las biovariedades *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, con una menor recuperación para estas dos últimas. Los límites de detección de aflatoxinas B₁ y B₂ en clara fueron de 0,15 y 0,06 µg/kg en tanto que para yema fueron de 0,13 y 0,12 µg/kg, respectivamente. La prevalencia de granjas positivas a *Salmonella* sp. fue del 60% (18/30). Sin embargo, sobre un total de 1.963 muestras analizadas para aislamiento

de *Salmonella* sp., sólo el 9,2% de las mismas (180) fueron diagnosticadas como positivas. Las muestras de hisopados de arrastre fueron las que presentaron mayor porcentaje de aislamientos de *Salmonella* sp. con un 32,5% de muestras positivas, mientras que no se aisló ninguna *Salmonella* sp. de huevo, agua de bebida o aire. En total se analizaron 888 muestras por PCR, detectándose un 5,1% de muestras positivas a *Salmonella* sp. (sobre 45 muestras analizadas), correspondiendo a muestras de excreta e hisopados de arrastre y cloacales. En cambio, ninguna muestra fue detectada como positiva utilizando PCR en alimento, huevo o agua de bebida. En total se necropsiaron 141 aves; en general las muestras de hígados, bazos y médula ósea fueron simultáneamente positivas en todas las aves estudiadas. Utilizando la aglutinación rápida en placa con antígeno Pullorum con los sueros de las aves, sólo 3 granjas tuvieron un porcentaje de positividad igual o mayor al $\geq 25\%$. Sin embargo, en 4 granjas, aunque los porcentajes de serología positiva fueron menores al 25%, se realizaron aislamientos de *Salmonella* sp tanto de las muestras ambientales como de los órganos. Se pudieron serotipificar 33 aislamientos como *S. Enteritidis*, todos ellos fueron positivos a la reacción de PCR específica para detectar a ese serotipo, estando presente tanto en muestras ambientales como en las de los órganos de los animales. Además, 40 aislamientos de cepas inmóviles, que fueron recuperadas de órganos, se serotipificaron todas como *S. Gallinarum*, siendo también confirmadas como positivas mediante un PCR específico para esa biovariedad. Todas las cepas de *S. entérica* subsp. *entérica* que fueron aisladas se confirmaron como positivas mediante un PCR específico para el género bacteriano. Las PCR específicas para *S. Typhimurium* y *S. Pullorum* fueron todas negativas. Por otro lado, en 6 granjas se detectó una infección simultánea por más de un serotipo de *Salmonella* paratífica móvil. No se encontraron niveles detectables de aflatoxinas en ninguna de las claras o yemas de los huevos que fueron analizados. Como resultado del análisis de los factores de riesgo, los galpones de las granjas localizadas en el departamento de Paraná presentaron el mayor riesgo de contaminación (OR=11,19) por *Salmonella* que los galpones de los restantes departamentos. El presente trabajo de Tesis aporta los primeros datos de prevalencia de *Salmonella* sp. y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras y en los huevos de consumo producidos en la provincia de Entre Ríos, Argentina.

Summary

The present work was carried out in laying hen farms from Entre Rios province in order to evaluate *Salmonella* sp. prevalence and aflatoxin presence in eggs. Furthermore, a risk factor study was carried out to both contaminant agents. In addition, the risk factors associated with the presence of *Salmonella* and/or aflatoxins were evaluated. Poultry feed, faeces and drinking water samples were artificially contaminated with motile *Salmonella enteric* subsp. *enterica* serotypes and non-motile *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* biovars and they were used to determinate the performance and the detection limits, comparing culture and PCR methods, using ANOVA and hypothesis test for statistical analysis. On the other hand, in order to detect aflatoxins in layer eggs, a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) methodology was applied to evaluate linearity, accuracy, precision, and blank, detection and quantification limits. A cross sectional study was conducted to determinate *Salmonella* prevalence in 30 farms from Entre Rios province that were selected to be sampled. Environmental (feces, feed, drinking water, air, eggs and boot swabs) and dead hens (organs, cloacal swabs and blood) samples were taken from the farms. This sampling plan took into account the farm distribution in the province and category of biosecurity, which has been suggested by the SENASA. If *Salmonella* was isolated in only one sample, the whole farm facilities were considered to be contaminated. On the other hand, a questionnaire (containing open and close questions) was filled, based on the biosecurity measures proposed by the SENASA regulation 542/2010 about risk factors assessment. A model for logistic regression was applied and odds ratios were determined in order to identify the risks. Cultural and PCR methods for the detection of *Salmonella* in feed, faeces and drinking water showed significant differences between motile serotypes and *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* biovars, with minor percentages of recovery for the last two biovars. The limit of detection for aflatoxin B₁ and B₂ was 0.15 and 0.06 µg/kg, and 0.13 and 0.12 µg/kg in egg white and yolk, respectively. *Salmonella* prevalence in laying hen farms was 60% (18/30). However, *Salmonella* was only isolated in 9.2% from 1,963 samples examined. The highest percentage of *Salmonella* isolations (32.5%) were found in the boot swab samples. In contrast, there were no *Salmonella* isolations from eggs, drinking water or air samples. Overall, 888 samples were analysed by PCR specific for the genus, finding that 5.1 % from 45 samples examined were found to be positive for *Salmonella*, only corresponding to samples of faeces, boots and cloacal swabs. In contrast, no eggs, drinking water and feed samples were found to be positive using the same PCR. Overall, 141 hens

were autopsied, finding that samples of liver, spleen and bone marrow were simultaneously positive in all the birds that were studied. Only 3 farms had a positive percentage $\geq 25\%$ of antibodies against *Salmonella* sp. detected by the Pullorum rapid plate serum agglutination test. Despite of that, *Salmonella* sp. was isolated from environmental and organs samples in 4 farms in which positive serology percentages were less than 25%. Thirty-three isolates were confirmed as *S. Enteritidis* serotype, being all of them positive by a PCR specific for this serotype. This pathogen was present in either environmental or organ samples. All non-motile *Salmonella* isolations were biotyped as *S. Gallinarum*, all of them were later confirmed using a specific PCR. All *Salmonella* isolations were confirmed by PCR as belonging to the genus level. All isolates were found to be negative for *S. Typhimurium* and *S. Pullorum*, using a specific PCR. On the other hand, a simultaneous infection caused by more than one motile paratyphoid *Salmonella* serotype was only found in 6 farms . There were no detectable levels of aflatoxins in any egg white or yolk. Regarding the risk factors considered herein, the poultry houses located in the Parana department had an augmented risk factor for a *Salmonella* infections in the laying hen flocks (OR=11.19) of this region. This work is the first report regarding a combined study of *Salmonella* and aflatoxin prevalence in laying hen farms and its possible transmission to the eggs for consumption from the Entre Ríos province of Argentina.

Capítulo 1

Introducción General

1.1. Producción de huevo para consumo

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, etc. delimitando claramente dos actividades distintas con características propias (Lamelas *et al.*, 2011).

La producción y el consumo de huevo de mesa ha cambiado significativamente en las últimas décadas en todo el mundo. El mayor aumento registrado en estos años se ha producido en Asia. El notable crecimiento de la producción en Asia ha producido un cambio considerable en la distribución geográfica de la producción de huevos. Mientras que en 1990 la contribución de los países asiáticos y europeos a la producción mundial fue bastante similar, la situación cambió por completo en 2008. En el mismo período de tiempo en que Europa perdió casi la mitad de su cuota anterior y los demás continentes también redujeron su participación en la producción global, Asia se encontraba en una posición dominante con una cuota del 58,6% (Windhors, 2011).

La producción mundial de huevos asciende a 65 millones de toneladas (con un peso promedio de 60 g/huevo), con 6.500 millones de ponedoras, lo que implica un importante crecimiento comparado con el año 2000, donde se produjeron 51,7 millones de toneladas. Sólo 5 países proveen el 55% de la producción total mundial de huevos. Actualmente, China es el país dominante en la región, contribuyendo al 63% de la producción de huevos del continente, seguido de Estados Unidos, India, Japón, y México. Para el 2015 se estima una producción de 70,4 millones de Tn y de 89,9 Tn para el 2030 (Executive Guide, 2012). África, Asia, América latina y el Caribe ganarán participación, mientras que Europa y América del Norte la perderán (Windhorst, 2008).

Entre 2000 y 2012 la producción de huevos en América ha subido de 10,4 millones de toneladas a un estimado de cerca de 13 millones de toneladas. Más de 40 por ciento del huevo de la región se produce en los Estados Unidos (EUA). México es el segundo mayor productor en la región (Figura 1.1) y probablemente su producción supere las 2,5 millones de toneladas en 2012. Por su parte, Argentina es el quinto productor de huevo en América, por detrás de Estados Unidos, México, Brasil y Colombia (Anónimo, 2012).

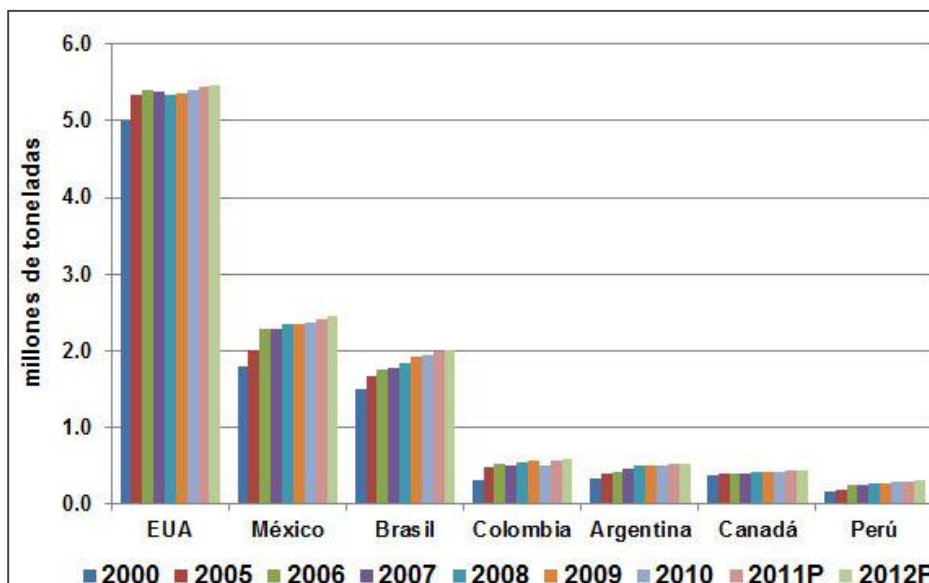


Figura 1.1. Principales productores de huevo en América y toneladas producidas desde 2000 a 2012 (Anónimo, 2012).

La industria del huevo de Argentina ha experimentado un crecimiento espectacular más o menos en la última década. Sólo uno por ciento de la producción se considera procede de sistemas sin jaulas, mientras que la proporción de huevos marrones y huevos blancos se dice es de 45:55. La producción de huevo en Argentina creció alrededor de 55 por ciento en los años 2000 a 2010 y ha subido de 327,000 toneladas a más de 500,000 toneladas. De acuerdo con los datos proporcionados por las autoridades argentinas a la FAO, el número de ponedoras en 2010 alcanzó 36,1 millones. La producción de huevos se indica en 9,020 millones, equivalente a un promedio de unos 250 huevos por ave. Sin embargo, el tonelaje de huevos producidos se calcula en un poco más de 505.000 toneladas e indicando un promedio de peso por huevo de 56 g (Anónimo, 2012).

Durante el año 2011 la producción de huevos de Argentina mostró un crecimiento del 4%. La producción estimada de huevo en cáscara para consumo alcanzó unos 9.701 millones de huevos, lo que representa 2, 4 % más de lo producido en el año anterior. El consumo total de huevos se estimó en 9,175 millones de huevos (2011), 3% más que en el año 2010. El consumo per cápita calculado alcanzó los 224 huevos por persona, 3 % más que en 2010 (Mair *et al.*, 2012a). La cantidad de huevos ingresados en plantas industrializadoras con habilitación de SENASA durante el año 2011 aumentó 21 % en comparación con el año 2010, totalizando casi 1.128 millones de huevos. Las exportaciones de huevo en cáscara del año 2011 fueron de 747 tn, 10 % menos que en el año 2010, por

un valor de 1.030 mil U\$\$ (+ 47 %). Los lugares de destino fueron: Israel, Angola, Gambia, Emiratos Árabes, entre otros (Mair *et al.*, 2012b).

En nuestro país, el 65,4% de la producción de huevos se localiza en las provincias de Buenos Aires (42,7 %) y Entre Ríos (22,7 %) (Lamelas *et al.*, 2011). Esta última tiene aproximadamente 268 granjas de ponedoras comerciales, el 70% de las mismas concentradas en la costa del río Paraná. En total para el año 2010 la producción de huevos de mesa fue de 1.197.055 cajones de 30 docenas cada uno en establecimientos de importancia comercial de Entre Ríos, aumentando la producción en 5.73 % respecto al mismo periodo del año anterior (2009), representado por 1.132.117 cajones de 30 docenas cada uno (Schell *et al.*, 2010).

Este tipo de producción industrial es una actividad que comenzó hace más de 40 años. Casi el 50% de la misma se realiza en galpones con vieja tecnología que tienen grandes restricciones para mantener la producción durante todo el año. La comercialización del huevo que realizan este tipo de productores avícolas se efectúa a través mayoristas, distribuidores, pequeños supermercados y almacenes o inclusive directamente al consumidor final. Presentan gran informalidad fiscal y sanitaria. El 50% restante de la producción de huevos se realiza con mayor tecnología, muchas veces importada, y con genética de calidad. Generalmente, la calidad de este huevo es superior, destinándose la producción a través de canales minoristas, super e hipermercados y la industria procesadora (Pont, 2008).

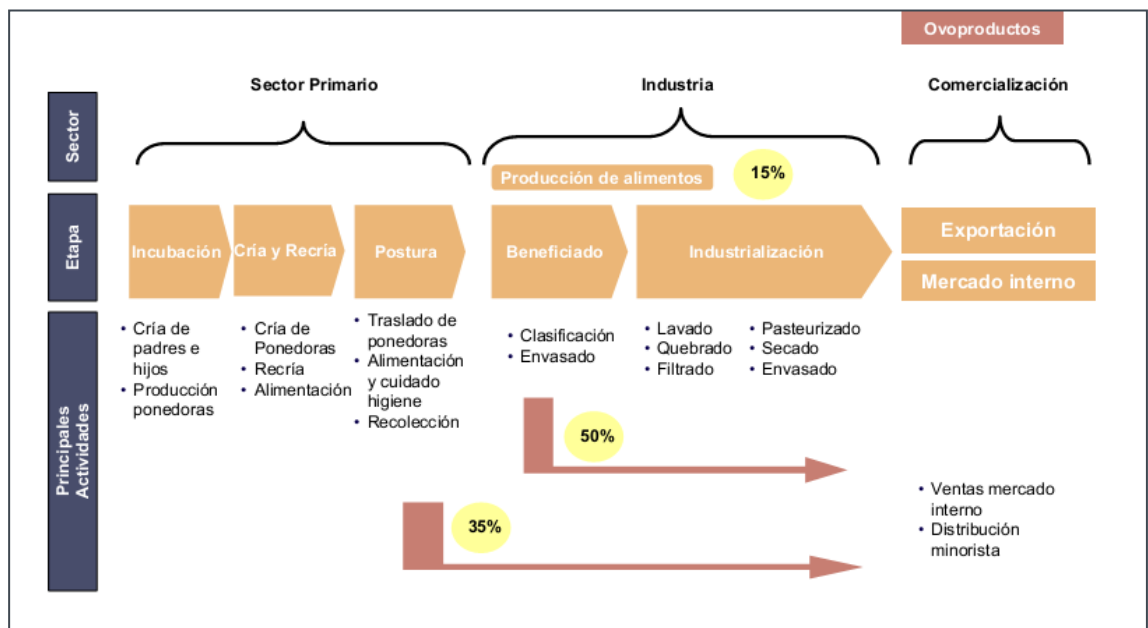


Figura 1.2. Esquema de la cadena de ovoproductos y huevo fresco (COFECYT, 2008).

La cadena de los ovoproductos y del huevo fresco incluye (Figura 1.2): la reproducción de las aves (importación y cría de abuelos, producción de padres), incubación (cría y reproducción de padres), la cría de gallinas ponedoras (recría, alimentación), la postura (traslado de ponedoras, alimentación y cuidado, higiene, recolección), la industrialización (lavado, quebrado, filtrado, pasteurizado, secado, envasado) y la comercialización del huevo (distribución, promoción, ventas, etc.) (Garzón *et al.*, 2010).

Aunque la cadena de producción de huevos está estrictamente organizada, no es una entidad aislada. Existe un intenso y frecuente contacto con otras partes de la producción avícola y el sector de la agricultura en general, lo que implica riesgos en la diseminación de enfermedades (Van Hoorebeke, 2010).

1.2. Aves de postura y sistemas de producción

Las gallinas ponedoras son el resultado de una selección genética y su explotación se realiza en establecimientos industriales. Como estas aves son susceptibles de enfermar requieren de un estricto control sanitario y del suministro de alimentos balanceados que proporcionen un rendimiento adecuado. A este grupo pertenece la raza Leghorn y líneas híbridas (Lohmann, Hy Line, De Kalb, Shaver). Como resultado de los avances genéticos, las actuales gallinas ponedoras comerciales son diferentes de aquellas de hace una década atrás. El peso corporal es menor, el número total de huevos puestos es mayor y la conversión alimenticia ha mejorado considerablemente (Miles y Jacob, 2000).

El ave de postura comienza su producción entre las 20 y las 24 semanas de vida al alcanzar la madurez sexual. El período productivo del ave generalmente finaliza cuando la producción no cubre los costos de alimentación, entre las 75 y las 80 semanas de vida. Posteriormente, suelen encontrarse muy delgadas y son faenadas como aves de desecho (Albarrán *et al.*, 2011). El período de tiempo que transcurre desde la finalización de la recría hasta que las gallinas alcanzan el pico de postura es el más exigente y estresante para las gallinas ponedoras. Durante esta etapa, el ave no sólo debe adaptarse a su nuevo entorno, también debe consumir suficiente energía y nutrientes para alcanzar el pico de producción (Miles y Jacob, 2000). Este período se caracteriza por una alta demanda de calcio para producir la cáscara del huevo (Albarrán *et al.*, 2011). Un buen manejo del lote durante este período es crítico y se debe intentar minimizar el estrés (Miles y Jacob, 2000).

En cuanto a los sistemas de producción de huevos, se han convertido en objeto de intensos niveles de control. Diversos factores tales como enfermedades, comportamiento, estrés, nutrición, características genéticas, entre otros, influyen los niveles de bienestar

de las aves de postura (Lay *et al.*, 2011). La producción en jaulas surgió entre 1930 y 1940 en los Estados Unidos y posteriormente se convirtió en el sistema de explotación más usado a nivel mundial. Se estima que del 70 al 80 % de la producción mundial de huevos deriva de este sistema tradicional (De Reu *et al.*, 2005). En estos sistemas tradicionales, las jaulas se ubican dentro de galpones que controlan la luminosidad, la temperatura además de la alimentación y la recolección diaria de huevos. Con ello se logra un control riguroso de la producción (Albarrán *et al.*, 2011). Dicho sistema presenta algunas ventajas como el ubicar más gallinas dentro de un mismo espacio. También permite un mayor control de la higiene, ya que las aves se encuentran separadas de sus excretas, hay menor interacción con el ambiente y se reducen los riesgos de mortalidad por canibalismo, picoteo de plumas o agresión (Van Hoorebeke, 2010).

En los países desarrollados, en particular los pertenecientes a Europa, se está tratando de cambiar este sistema de producción de huevos (Garzón *et al.*, 2010). La producción avícola con sistemas alternativos o *free-range* (“salida a pradera”) es cada vez más común. Su objetivo es la obtención de alimentos de alta calidad, con óptima utilización de recursos con respecto al medio ambiente. Su principal característica es que las gallinas tienen acceso al exterior, donde pueden disfrutar de la luz natural, escarbar en la tierra, etc. (Albarrán *et al.*, 2011). Un mayor espacio permite a las aves realizar un repertorio más amplio de comportamientos (Lay *et al.*, 2011). Sin embargo, bajo este sistema se pierde el control de la transmisión de enfermedades y las gallinas están más expuestas a depredadores, aves silvestres y focos de infección (Albarrán *et al.*, 2011). En Argentina, prácticamente la totalidad de la producción de huevos se hace bajo la forma de gallina enjaulada (Garzón *et al.*, 2010), siendo las razas de gallinas más utilizadas las Hy-Line, Lohmann, Shaver y H&N (Aho y Wrigth, 2010).

Poco se conoce acerca del estrés que cada sistema de producción impone sobre las gallinas de postura. Aparentemente, ningún sistema de producción es ideal para el bienestar del ave. Por ello, cualquier intento para evaluar la sustentabilidad de un cambio a los sistemas alternativos requiere cuidadosa consideración de las ventajas y desventajas de cada uno (Lay *et al.*, 2011).

1.3. Producción de huevos e inocuidad alimentaria.

Existen dos preocupaciones principales en cuanto a inocuidad alimentaria y la producción de huevos: la contaminación microbiana y la contaminación química. La contaminación microbiana relacionada con la presencia de bacterias del género *Salmonella*,

en particular *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), continúa siendo una cuestión primordial, aunque la contaminación química no debe ser subestimada (Holt *et al.*, 2011).

Entre los contaminantes químicos, que pueden estar presentes en el huevo, se encuentran las dioxinas, los pesticidas y metales pesados (Holt *et al.*, 2011). Otro tipo de contaminante químico, de origen biológico, son las micotoxinas. Estas últimas corresponden a metabolitos secundarios producidos por muchas especies de hongos filamentosos (Garrido Frenich *et al.*, 2011).

1.4. Género *Salmonella*

El nombre del género *Salmonella* fue sugerido por Lignières en 1900, en reconocimiento al trabajo del bacteriólogo norteamericano D.E. Salmon, quien junto a su colaborador T. Smith describieron en 1886 el bacilo de la peste porcina, originalmente denominado *Bacillus cholerasuis*. Luego, este microorganismo recibió el nombre de *Salmonella Cholerasuis* (Bell y Kyriakides, 2002). En la década de 1960, el nombre *Salmonella* fue ampliamente aceptado para designar un género específico de la familia *Enterobacteriaceae*. Posteriormente, en el año 2005, *Salmonella enterica* fue designada como la especie tipo para el género.

El género comprende bacilos Gram-negativos, pequeños (0,7-1,5 μm de ancho x 2-5 μm de largo), rectos, la mayoría móviles con flagelos peritricos. Reducen los nitratos a nitritos, en general fermentan la glucosa con producción de gas, producen sulfuro de hidrógeno y son capaces de desarrollar en medios de cultivo que sólo disponen de citrato como única fuente de carbono. Además, no hidrolizan el indol ni la urea, no fermentan la lactosa, sacarosa, salicina e inositol y descarboxilan la lisina y ornitina (Mølbac *et al.*, 2006). Sin embargo, en la literatura se describe que 1% de las cepas de *Salmonella* fermentan lactosa (Edwards y Ewing, 1986) y algunas también a la sacarosa (Gonzalez, 1966).

1.4.1. Nomenclatura y taxonomía

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 usando muchos de los métodos descriptos y desarrollados por P.R. Edwards y H. W. 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 y flagelares O y H, respectivamente (Brenner *et al.*, 2000). Actualmente se reconocen aproximadamente unos 2.400 serotipos (Tabla 1.1), incluidos en tres especies, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* y *Salmonella subterranea* (Su y Chiu, 2007).

Tabla 1.1. Nomenclatura del género *Salmonella* (Su y Chiu., 2007).

Taxonomía (formato de escritura) y nomenclatura				
Género (Mayúscula, itálica)	Especie (Itálica)	Subespecie (itálica)	Serotipo (o serovariedad) con mayúscula, sin itálica	Número de serotipos en cada especie o subespecie
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium	1.504
		<i>salamae</i> (II)		502
		<i>arizonae</i> (IIIa)		95
		<i>diarizonae</i> (IIIb)		333
		<i>boutenaе</i> (IV)		72
		<i>indica</i> (VI)		13
	<i>bongori</i>	V		22
<i>subterranea</i>			1	

1.1.2. Especificidad de hospedador para la infecciones por *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza; se los encuentra tanto como comensales o patógenos 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). Dichas enfermedades se denominan salmonelosis y presentan una variación en la morbilidad y mortalidad según la especie afectada y los huéspedes intervinientes (Tunes y Vigo, 2007). Desde el punto de vista de los hospedadores a los que infecta, las salmonelas se pueden clasificar en tres grupos (Caffer y Terragno, 2001):

- a. 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 todos los serotipos de *S. enterica* causantes de zoonosis.

- b. Las que sólo están adaptadas al hombre y nunca causan enfermedad en los animales: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Paratyphi C*. Se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra.
- c. Las que sólo están adaptadas a una determinada especie animal y rara vez causan enfermedad en el hombre: *S. Abortusovis*, en ovinos; *S. Abortusequi*, en equinos y *S. Gallinarum*, en aves.

1.4.3. Aspectos de Salud Pública de serotipos de *S. enterica* causantes de zoonosis.

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* se encuentra en los animales y los microorganismos son transmitidos al hombre, ya sea directamente 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). Las salmonelas 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, ancianos y aquellos individuos inmunocomprometidos o aquellos que padecen enfermedades crónicas son los más vulnerables a la salmonelosis (Bell y Kyriakides, 2002).

El incremento de los casos de salmonelosis 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 el comportamiento humano, migraciones internas y comercio inapropiado de alimentos. 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; son factores que han contribuido también a aumentar su frecuencia. Surge de este modo la necesidad de implementar medidas de prevención y 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.*, 2006).

Una de las principales causas por las que resulta exigua la información, es que la mayoría de los países denuncian los casos basados en la vigilancia sindrómica; por lo cual en casi todos los brotes investigados, no existe vigilancia formal de laboratorio. Si bien este sistema se estableció al comienzo de los años noventa, todavía persisten diversas debilidades en muchos países en lo que respecta a la vigilancia epidemiológica, a los reportes de enfermedades, a la detección e investigación de brotes y al análisis de datos para la toma de decisiones (Abriata *et al.*, 2006).

En Europa, el número de casos de salmonelosis humanas fue mayor a 100.000 en 1997, disminuyendo la incidencia a 73.000 casos en 2001. Hasta el 2005 fue la bacteria más común implicada en enfermedades de transmisión alimentaria con casi 200.000 casos informados ese año, con una incidencia de 40/100.000. Se estima que el gasto por la salmonelosis en humanos pudo ser tan alto como 3.000 millones de euros por año (EFSA, 2008b).

Por otra parte, aproximadamente el 60% de los casos reportados por el Centro de Control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés, Center for Disease Control and Prevention, CDC) fueron causados por los serotipos *S. typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* y *S. Heidelberg*. Estos últimos cuatro serotipos aparecen nuevamente en los datos del CDC para el período 1999-2009 (CDC, 2011).

En Argentina, la salmonelosis, 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* sp. se encuentra en el cuarto lugar (AGC, 2011). A partir de 1972, por un brote de fiebre tifoidea, se serotificaron 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, *S.*

Enteritidis fue el serotipo más frecuente en humanos, excepto durante dos años: 1991, año en el cual fue superada por *S. Typhimurium* y en 1992 por *S. Infantis*. Para los años 2007 a 2009, Caffer *et al.* (2010) informaron que *S. Typhimurium* fue el serotipo que se aisló con mayor frecuencia en humanos, animales y alimentos, desplazando a *S. Enteritidis* del primer lugar de los aislamientos de origen humano.

Los serotipos de *Salmonella* causantes de zoonosis claramente 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 serotipos han sido asociados con el consumo de carne de pollo, huevos y derivados (Foley *et al.*, 2008). Estos productos avícolas se encuentran entre los alimentos más comúnmente implicados en los brotes de intoxicación alimentaria de la mayoría de los países industrializados (Bell y Kyriakides, 2002). Durante el período 1993-2002 se han registrado en Latinoamérica 1.256 brotes de salmonelosis, que afectaron a 48.334 personas y produjeron 15 muertes. El 29,2% de los casos fue consecuencia del consumo de huevos o productos derivados y el 9,4%, fue debido a la ingesta de carne de aves (Velilla *et al.*, 2006). Por su parte, en Argentina, los brotes de origen alimentario fueron causados principalmente por mayonesas caseras, cremas con huevo crudo, aderezos y pollos insuficientemente cocidos (Michanie, 2007).

1.4.4. Salmonelosis en *Gallus gallus*

Diversos factores pueden afectar la susceptibilidad de las aves de corral a la colonización por *Salmonella* (Bayley, 1988). Estos factores incluyen:

- a. Edad de las aves.
- b. Serotipo de *Salmonella* implicado y el nivel de la dosis infectiva inicial.
- c. Estrés (ambiental, de transporte o el causado por otra enfermedad subclínica o aguda).
- d. Presencia de aditivos en el alimento, tales como antimicrobianos o anticoccidiales.
- e. Resistencia del patógeno a la acidez del estómago.
- f. Competencia con la microflora del intestino.
- g. Condiciones genéticas del hospedador.
- h. Factores ambientales como aire, polvo, instalaciones sin higiene.
- i. Vectores animados como insectos, humanos, roedores u otros animales.

- j. Vectores inanimados tales como vestimenta e implementos avícolas contaminados.

Las bacterias del género *Salmonella* pueden causar infecciones asintomáticas en las aves, o bien manifestarse clínicamente, produciendo altos niveles de mortandad. En el caso de las infecciones asintomáticas, las aves portadoras pueden facilitar la diseminación del patógeno dentro del lote (Dunkley *et al.*, 2009).

En cuanto a los serotipos encontrados en las aves de corral, además de *S. Gallinarum* (serotipo específico para las aves), muchos otros serotipos de *S. enterica* pueden afectarlas, aunque entre ellos predominan *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Heidelberg*. Antes de la década de 1960, *S. Enteritidis* fue rara entre las aves de corral; sin embargo con la reducción de *S. Gallinarum* biovariedades *Gallinarum* y *Pullorum*, la prevalencia de *S. Enteritidis* aumentó (Foley *et al.*, 2008).

Se utiliza el término paratifosis para describir la enfermedad causada por los serotipos de *Salmonella* zoonóticos. El término tifosis aviar y pullorosis o diarrea blanca bacilar designan las infecciones causadas por las salmonelas no zoonóticas, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, respectivamente (OIE, 2008).

1.4.4.1. Pullorosis y Tifosis aviar

La pullorosis y tifosis aviar son dos enfermedades septicémicas específicas de aves (aves de corral y otras especies de producción, incluyendo aves de caza, patos y faisanes). Estas enfermedades siguen teniendo importancia económica, debido a las pérdidas que causan en muchas partes del mundo. Aunque son susceptibles las aves de todas las edades, la tifosis aviar, usualmente afecta a las aves adultas, mientras que la pullorosis es más común en aves jóvenes (Barrow y Freitas Neto, 2011). La tifosis aviar y la pullorosis, tienen muy baja posibilidad de curación. Este hecho determina la interrupción del ciclo productivo del establecimiento y, por consiguiente, una elevada pérdida económica. Asimismo, la contaminación de poblaciones de gallinas ponedoras de huevos para consumo, sumado a la irregular respuesta de las vacunas y a malas maniobras de manejo, resulta en una espiral de difusión de la enfermedad que anualmente suma enormes cifras contabilizadas como pérdidas por mortalidad y falta de producción. En el caso de la tifosis se registran pérdidas muy elevadas pues se requiere el sacrificio de todas las aves reproductoras del lote como único método posible de erradicación de la enfermedad y en gallinas en postura no vacunadas la mortandad suele ser muy elevada (Huberman, 2010).

Ambas enfermedades se encuentran distribuidas mundialmente. Los países que han aplicado estrictos planes de control han logrado erradicar estas enfermedades de las explotaciones industriales, aunque en algunos casos se detectan estas bacterias en poblaciones de aves silvestres o domésticas criadas en pequeños establecimientos de campo (Chacana y Terzolo, 2003). Se ha sugerido que la desaparición de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* de los lotes avícolas de Europa y Estados Unidos durante el período de 1960 a 1980 ha sido el motivo del resurgimiento de un fagotipo específico de *S. Enteritidis*. Se postuló que este último serotipo ocupó el nicho ecológico vacante de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Barrow y Freitas Neto, 2011). Sin embargo, este hecho no es concluyente, ya que en varios países latinoamericanos coexisten ambas enfermedades (Terzolo, 2008). En muchos países son escasos los datos oficiales relacionados a la ocurrencia de pullorosis y tifosis aviar por lo que probablemente la incidencia de estas enfermedades es subestimada. De acuerdo a la base de datos de la Organización Mundial para la Salud Animal, los Estados Unidos reportaron su último caso de tifosis aviar en 1981, por otro lado, se reportaron casos de pullorosis en aves de traspatio hasta 2009 (Barrow y Freitas Neto, 2011). En cuanto a Europa, se han detectado brotes en distintos países. En el Reino Unido, *S. Gallinarum* fue aislada de una granja comercial y de un pequeño criadero en el año 2005. En España no se han reportado casos de tifosis o pullorosis desde 1991 y 1999, respectivamente. En Alemania, ambas enfermedades se diagnosticaron entre 2005 y 2008 (Barrow y Freitas Neto, 2011). Ambas enfermedades son frecuentes en los países de Asia. Korea ha cobrado importancia en relación a la tifosis aviar, debido al informe de 1.000 brotes entre los años 2000 y 2008 (Kwon *et al.*, 2010).

En cuanto a la historia de la tifosis aviar en la Argentina, a fines de 1973, comienza una inusitada diseminación de *S. Gallinarum*, afectando a aves de todo tipo. Actualmente, se puede concluir que los principales factores responsables de las epizootias registradas en el país entre 1974 y 1976 fueron: la llegada al país de abuelos contaminados de una línea genética que manejaba un 30% del mercado; la diseminación, a través de reproductores padres, de la infección a todas las regiones del país; el ocultamiento y mantenimiento de la enfermedad en razón de los buenos precios de mercado; el intento de erradicar la enfermedad con tratamientos antimicrobianos; el uso de vacunas ineficaces. Actualmente, en el país, la tifosis aviar ha desaparecido en el caso de las granjas de aves de corral reproductoras. Sin embargo, no ha ocurrido lo mismo con ponedoras comerciales (SENASA, 2002). En los años 2007, 2008 y 2009 se reportaron 12, 41 y 31 casos, respectivamente en el país (Terrera, 2012). En cuanto a la pullorosis, en 1967 el SENASA a

través del decreto 7816/1967, aplica un plan nacional de lucha contra esta enfermedad en vista que la misma era uno de los principales problemas sanitarios que afectaban a la avicultura argentina en ese momento. Actualmente, la pullorosis se considera controlada y su presencia se considera excepcional quedando reducida a algunas razas puras o de alta consanguinidad (SENASA, 2002).

La transmisión vertical es la transmisión de un agente patógeno desde uno de los progenitores, generalmente la madre, a la cría. La transmisión horizontal es la transmisión de la enfermedad desde un animal infectado a un animal jamás expuesto, independientemente de la relación parental de los individuos (Kurkjian *et al.*, 2010). Aunque el dogma general afirma que la transmisión de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* puede darse tanto por vía horizontal como vertical, los primeros reportes en la literatura indican que la transmisión horizontal es más significativa para *S. Gallinarum* mientras que ambas rutas de transmisión son importantes para *S. Pullorum* (Barrow y Freitas Neto, 2011). La transferencia horizontal puede ocurrir por ingesta de heces infectadas o por canibalismo. En cuanto a la tasa de transmisión vertical, la presencia de *S. Gallinarum* 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). La evidencia en la literatura indica que la transmisión vertical está asociada con infecciones persistentes en ausencia de casos clínicos (Berchieri Júnior *et al.*, 2000).

La sintomatología es muy similar en la tifosis y pullorosis. Las aves pueden manifestar depresión, somnolencia, anorexia, alas caídas, deshidratación, respiración dificultosa, diarrea, debilidad y adherencia de las heces a la cloaca. Los síntomas se manifiestan después del 7º día post infección (Chacana y Terzolo, 2003).

Los signos *post mórtem* de la pullorosis en los polluelos recién eclosionados son peritonitis acompañada de la congestión generalizada de los tejidos y la inflamación del saco vitelino no absorbido. Las infecciones más duraderas conducen generalmente a tiflitis con desarrollo de proyecciones cecales necróticas y pequeños focos necróticos en el hígado, los pulmones y otras vísceras. Las lesiones en el hígado y en el bazo de las aves con pullorosis pueden presentar la apariencia de puntos blancos que no se observan en los casos de tifosis aviar. Las aves adultas pueden desarrollar ovarios deformados y reducidos con folículos adheridos por tallos fibrosos pedunculados. En el caso de la tifosis aviar, además de signos generalizados de septicemia, se observa el hígado agrandado, oscuro y de consistencia friable. Frecuentemente, la médula ósea presenta también un color marrón oscuro (OIE, 2008). García *et al.* (2010) evaluaron los cambios histopatológicos y los componentes de

suero de gallinas infectadas con *S. Gallinarum* durante diez días. Estos autores encontraron que las proteínas totales disminuyeron a partir del tercer día, las concentraciones de albúmina mostraron alteraciones en el quinto día post inoculación. Esta reducción coincidió con la degeneración de los hepatocitos, necrosis multifocal e inflamación del hígado en la mayoría de las aves. Por otro lado, también observaron disminución en las concentraciones de calcio y fósforo.

Aunque contra *S. Gallinarum* se han preparado tanto vacunas vivas como inactivadas, la vacuna más utilizada se ha preparado a partir de la cepa rugosa 9R (OIE, 2008). Esta vacuna es la única aprobada por las autoridades sanitarias para la prevención de la tifosis aviar y sólo para gallinas ponedoras en Argentina. Se ha demostrado que el empleo combinado de las vías oral e inyectable brinda protección más completa. Este sería un tipo de vacuna muy efectiva, aunque con cierto poder patógeno residual (Huberman, 2010). Una ventaja de la vacuna 9R, es que adicionalmente protege contra *S. Enteritidis* (Barrow *et al.*, 1991; Feberwee *et al.*, 2001). También se efectuaron ensayos con otras cepas atenuadas de *S. Gallinarum*, pero no mostraron ser mejores que la cepa 9R (Chacana y Terzolo, 2003).

Se han considerado otras posibilidades biológicas para el control de *S. Gallinarum*, como por ejemplo preparaciones probióticas. Muchas de estas preparaciones contienen alto número de lactobacilos, que incorporados al alimento pueden reducir la colonización intestinal por parte de los serotipos zoonóticos. Sin embargo, ensayos *in vivo* sobre *S. Gallinarum* no mostraron efectos significativos sobre este patógeno (Barrow y Freitas Neto, 2011).

1.4.4.2. Paratifosis aviar

Los numerosos serotipos móviles de *Salmonella* sp. se conocen usualmente con el nombre de salmonelas paratíficas. El primer reporte de infección paratífica en aves data de 1895, en un brote en palomas (Gast, 2008). De los más de 2400 serotipos de *Salmonella* sp. identificados, sólo una pequeña proporción (aproximadamente el 10%) son comunes en la producción avícola. Existe una importante relación epidemiológica entre los productos avícolas y las infecciones en humanos, debido a que muchos de los serotipos encontrados en humanos (como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*) son comunes a los encontrados en la producción avícola (Gast, 2007a).

Los registros mundiales de la frecuencia de aislamiento de serotipos de *Salmonella* de origen avícola generan un amplio rango de resultados. La asociación epidemiológica de *S.*

Enteritidis con la transmisión de la enfermedad a través de los huevos contaminados convirtió a la prevalencia de este serotipo en un tema de particular interés (Gast, 2008). *S. Enteritidis* ha sido el serotipo más frecuentemente aislado de huevo en Italia (Busani *et al.*, 2005), carcasas de pollo en Polonia, España y Korea (Capita *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2003; Mikołajczyk y Radkowski, 2002). *S. Heidelberg* se encontró en Canadá en pollos parrilleros y pavos (Guerin *et al.*, 2005) y en gallinas ponedoras de los Estados Unidos (Kinde *et al.*, 2005); *S. Typhimurium* fue aislada de pollitos parrilleros en Estados Unidos (Liljebjelke *et al.*, 2005). *S. Livingstone* y *S. Infantis* fueron aisladas en ambientes de producciones avícolas en Japón (Murase, *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2001) mientras que *S. Kentucky* y *S. Agona* se encontraron en carne de pollo en los Estados Unidos (Logue *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006).

En los países latinoamericanos, la evolución de la incidencia o prevalencia de la paratifosis ha sido inversamente proporcional a los progresos y mejoras que han aportado el manejo, alojamiento y nutrición (SENASA, 2002). En Argentina, en la década de los años 80, se aislaron de granjas *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Livingstone* mientras que el serotipo Anatum y otros serotipos fueron aislados de harinas utilizadas para la fabricación de alimentos balanceados y de aves faenadas (Terzolo, 1980; Mercado, 1983; De Franceschi *et al.*, 1988). Durante el período 1986-1993 se aislaron 68 cepas de *S. Enteritidis* de criaderos de pollos parrilleros, reproductores pesados y gallinas ponedoras, el 38% correspondientes al fagotipo PT4, el 8% al PT 7 y el 16% restante a los PT 1, PT 5-a, PT 9-a y PT 12. Todas estas cepas presentaron transmisión vertical y horizontal y alta patogenicidad. De este modo, en Argentina la mayoría de las infecciones en criaderos de aves fueron causadas por cepas del PT 4 o sus derivados PT 34 y PT 7. Todas estas cepas tienen muy alta patogenicidad y la mayoría son originarias de Europa, donde se detectaron y describieron los primeros brotes de la enfermedad asociadas al PT 4 (Velilla *et al.*, 2004). Sandoval *et al.* (1989) describieron casos de paratifosis causados por *S. Enteritidis* en dos planteles de aves de la Provincia de Buenos Aires. En estos casos la infección inicial ocurrió en diferentes etapas del ciclo productivo siguiendo la enfermedad un curso distinto y produciendo alteraciones desiguales en el rendimiento. Además de *S. Enteritidis*, en segundo lugar deben considerarse cepas patógenas de *S. Typhimurium*, que si bien actualmente son menos frecuentes como causa de paratifosis en aves, tienen también mucha importancia por su potencial patogenicidad para el hombre, las aves y los animales. Por su parte, el Plan Nacional de Sanidad avícola de Argentina (SENASA, 2002) tiene

incorporados para su control a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg*, esta última por su presencia en tracto digestivo y contaminante importante de carcazas post-faena.

La morbilidad o mortalidad no están asociadas de manera consistente con la paratífosis en aves adultas. En general, no se informan signos o enfermedad clínica en infecciones experimentales con grandes dosis orales de salmonelas paratíficas (Humphrey *et al.*, 1989). Las dos características observadas con mayor frecuencia en las aves adultas son la colonización intestinal y la diseminación hacia los órganos internos. Okamura *et al.* (2001) inocularon gallinas adultas con 5×10^6 UFC de *Salmonella*, empleando seis serotipos por separado (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Infantis* o *S. Montevideo*). El único serotipo asociado con signos clínicos de depresión y disminución en la alimentación fue *S. Enteritidis*, serotipo que causó una bacteremia más prolongada.

En el caso de las aves jóvenes, la mortalidad asociada con infecciones paratíficas naturales alcanza el pico máximo entre los 3 y 7 días de edad. Estudios experimentales han demostrado que las aves recién nacidas son más susceptibles a las salmonelas, pero esta susceptibilidad disminuye con el tiempo. Sandoval *et al.* (1989) pudieron observar anorexia, emaciación y caquexia en pollitos BB afectados por *S. Enteritidis*. En las necropsias, estos autores hallaron congestión hepática y reabsorción incompleta del saco vitelino.

El uso de vacunas vivas o inactivadas reduce la susceptibilidad de las aves de corral a las infecciones por salmonelas paratíficas. Sin embargo, ningún tipo de vacuna provee una barrera impenetrable a la infección, por lo que la vacunación es más efectiva si está contemplada dentro de un programa de higiene y rutinas de manejo (Gast, 2008). Con el aumento del estudio de la patogénesis de *S. enterica*, se han propuesto mutantes como vacunas potenciales, sin el sistema de secreción tipo III codificado por la isla de patogenicidad 1 ó 2 (Matulova *et al.*, 2012).

En la actualidad, se encuentran disponibles vacunas vivas atenuadas de *Salmonella* Enteritidis en varios países de América Latina, pero no en Argentina. Las vacunas vivas atenuadas han sido desarrolladas mediante manipulaciones genéticas o metabólicas, alterando su patrón de resistencia a antibióticos específicos y su capacidad de replicación. Las vacunas vivas atenuadas invaden y colonizan el tracto gastrointestinal, compitiendo con cepas de campo por receptores de adhesión localizados en los enterocitos (células localizadas en el borde de las vellosidades intestinales). Sin embargo, la baja capacidad de multiplicación y diseminación a órganos internos, permite la eventual eliminación de la cepa vacunal por parte del sistema inmune de las aves. Igualmente, las cepas vacunales de *Salmonella* Enteritidis se caracterizan por no interferir con las pruebas rutinarias de

diagnóstico empleadas para detectar infecciones por este serotipo. La cepa vacunal de *Salmonella* Enteritidis se caracteriza por su susceptibilidad a la eritromicina y resistencia a la estreptomomicina y rifampicina, mientras que las cepas de campo presentan un comportamiento totalmente opuesto frente a dichos antibióticos. Debido al grado de atenuación, este tipo de vacuna viva se puede administrar en agua de bebida o por aspersión en aves de hasta un día de edad (Alvarado, 2009). Por otro lado, la protección mediante el uso de bacterinas (vacunas muertas) reduce la colonización intestinal, pero no la elimina (Wolfenden *et al.*, 2010).

1.4.4.3. Patogenia de la infección en la salmonelosis aviar

Si bien la patogénesis de *Salmonella* ha sido bien caracterizada en mamíferos, la información de los mecanismos específicos en las aves es limitada (Dunkley *et al.*, 2008). La salmonelosis de las aves tiene tres fases distintas durante las cuales hay una interacción significativa con el sistema inmune (Chappel *et al.*, 2009):

- a. Fase I. Invasión intestinal. La mayoría de las infecciones por *Salmonella* en aves ocurre, del mismo modo que en los mamíferos, por la vía fecal-oral. Las bacterias pasan a través del buche, cuyo ambiente ácido (pH 4-5) induce mecanismos de adaptación en el microorganismo, que lo ayudan a alcanzar el proventrículo y la molleja. Siguiendo el curso de la infección, se produce un flujo de heterófilos y macrófagos hacia el lumen intestinal. La infección con *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* no produce una inflamación entérica substancial, a diferencia de lo que ocurre con *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*.
- b. Fase II. Desarrollo de infección sistémica. Las bacterias son fagocitadas por los macrófagos y transportadas viables dentro de estas células a través del sistema linfático hasta el hígado y bazo. La interacción entre *Salmonella* y los macrófagos es la clave para la progresión de la infección sistémica, tanto en aves como en mamíferos. *Salmonella* ha desarrollado sistemas para mediar su supervivencia dentro de los macrófagos, particularmente la isla de patogenicidad 2 (SPI-2, por sus siglas en inglés). Este sistema previene la fusión de los fagosomas con los lisosomas; la ausencia de una SPI-2 funcional impide sobrevivir a la *Salmonella* dentro de los macrófagos y produce una atenuación de las infecciones sistémicas cuando las aves se infectan con cepas de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* o *S. Typhimurium* carentes de SPI-2.

c. Fase III. Eliminación, persistencia o muerte. Luego del establecimiento de la infección sistémica, el ave puede eliminar o controlar la multiplicación bacteriana mediante su sistema inmune. En el caso que la infección no pueda eliminarse, pero queda controlada, el ave puede convertirse en portadora. Si la multiplicación no es controlada por los mecanismos de inmunidad innata, la *Salmonella* se multiplica en el bazo y en el hígado causando lesiones en estos órganos (hepato y esplanomegalia). Si la infección progresa puede causar la muerte del animal.

La mayor parte de la evidencia de los mecanismos de limpieza inmunitaria en la infección por *Salmonella* surge de datos experimentales de infección por *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*. Inicialmente, la etapa sistémica de *S. Typhimurium* induce la expresión de citoquinas proinflamatorias. Si el sistema inmune innato no logra controlar la multiplicación bacteriana entonces las respuestas humorales y celulares hacen posible la limpieza, mediada por tales citoquinas. En cuanto a *S. Gallinarum*, la principal dificultad en determinar la respuesta inmune asociada es la virulencia en modelos de infección experimentales (Chappell *et al.*, 2009). Setta *et al.* (2012) demostraron en estudios *in vitro* que existe una expresión diferencial de las citoquinas proinflamatorias del huésped, dependiendo del serotipo estudiado. En el caso de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, promueven poca expresión de estas citoquinas. Esta capacidad para limitar la respuesta inflamatoria sería parte de una estrategia para la exitosa invasión sistémica del ave por parte de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

1.5. Formación del huevo e infección con salmonelas

El sistema reproductor de la gallina (Figura 1.3 A) se divide en dos regiones: ovario y oviducto izquierdo. El ovario y oviducto derecho, si bien existen en el ave joven, se atrofian durante la maduración del aparato reproductor y no son funcionales en el ave adulta (Howard *et al.*, 2012). El ovario en la gallina adulta presenta numerosos folículos en distintas etapas de desarrollo. Cada folículo está formado por capas concéntricas de tejido que rodean al oocito o yema. Estas capas desde adentro hacia afuera son: una capa perivitelina acelular, una capa monocelular llamada granulosa, una capa basal, dos tecas (interna y externa) con células intersticiales, una capa de tejido conectivo y un epitelio superficial. El oviducto, se extiende desde las proximidades del ovario hasta su desembocadura en la cloaca. En él se distinguen varios segmentos (Asensio, 2009):

1. Infundíbulo: es el primer segmento del oviducto, tiene forma de embudo y es una zona muy fina, casi transparente.
2. Magnum: es el segmento más largo, posee células y glándulas secretoras.
3. Istmo: está claramente diferenciado del segmento anterior, por ser más pequeño y menos plegado.
4. Útero o glándula de la cáscara: destaca el espesor de sus paredes musculares y numerosos pliegues en distintas direcciones.
5. Vagina: une el útero con la cloaca.

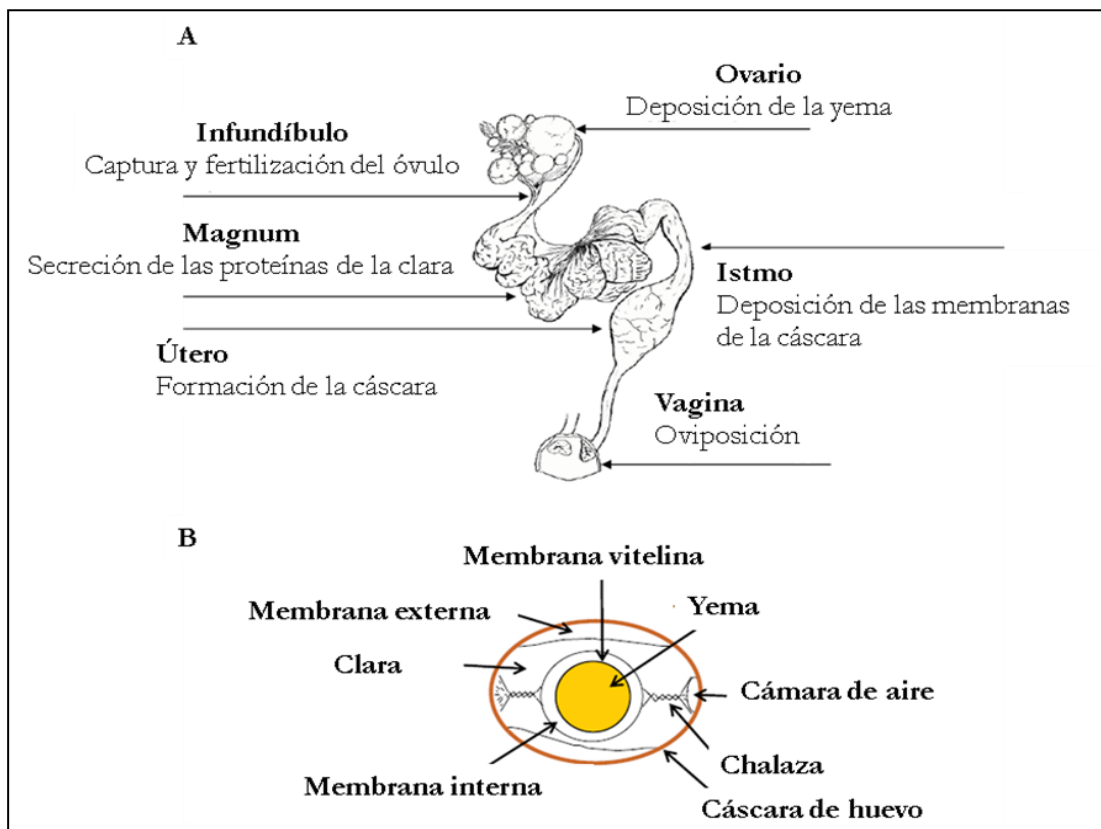


Figura 1.3. Partes del aparato reproductor de la gallina (A) y estructura del huevo (B) (Jonchère *et al.*, 2010)

Durante la formación del huevo, en el ovario maduran los óvulos y se acumulan las proteínas de la yema. Después de la ovulación la yema ingresa al oviducto donde se irán depositando secuencialmente la clara, las membranas de la cáscara y la cáscara en el magnum, el istmo y el útero, respectivamente. La gallina produce entonces una estructura cerrada, completamente autosuficiente y biológicamente aséptica que asegura el desarrollo extrauterino del embrión (Jonchère *et al.*, 2010). Por lo tanto, el huevo necesita de un

sistema de defensa, tanto físico como químico que limite la contaminación microbiana durante el desarrollo del embrión (Howard *et al.*, 2012).

Dentro de las defensas físicas del huevo, se encuentran la cutícula, la cáscara y las membranas de la cáscara. La cutícula, es una capa proteica, secretada sobre la cáscara inmediatamente antes de la oviposición, siendo la primera defensa física del huevo. La cáscara posee entre 7.000 a 17.000 poros y representa una de las barreras más visibles a la contaminación externa. Por debajo de la cáscara, se encuentran las membranas externa e interna de la cáscara (Figura 1.3 B). Estas membranas están totalmente unidas excepto en la zona de la cámara de aire, la cual se forma luego de la oviposición, al separarse ambas membranas.

Entre las defensas químicas del huevo, se encuentran en la clara la lisozima, la ovotransferrina y el ovomucoide, entre otros. La lisozima rompe los enlaces N-acetilneuramina y N-acetilglucosamina de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y también es capaz de formar poros en la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Kang *et al.*, 2006). La ovotransferrina es un agente quelante que secuestra el hierro de la clara y, de esta manera, no queda disponible para las bacterias. El ovomucoide es una proteinasa inhibidora que impide que las bacterias utilicen las proteínas de la clara. Por último, la membrana vitelina, que rodea a la yema, mantiene su integridad y evita que la clara y yema se mezclen, lo que debilitaría las defensas del huevo al permitir el paso de los nutrientes y un exceso de hierro hacia la clara (Howard *et al.*, 2012).

Existen dos rutas posibles para la contaminación del huevo por *Salmonella*. En la ruta transovárica o transmisión vertical, la membrana de la yema o de la clara se contamina directamente como resultado de la infección de los órganos reproductivos (ovarios u oviductos), antes de la formación de la cáscara. En la transmisión horizontal, la salmonela penetra a través de la cáscara (Messens *et al.*, 2006), desde el intestino colonizado o las excretas durante o después de la oviposición. Mientras que los serotipos de *Salmonella* aislados de la cáscara de huevo son diversos, la contaminación interna en huevos intactos está dominada por *S. Enteritidis* (Gantois *et al.*, 2009).

1.5.1. Contaminación del huevo antes de la oviposición.

La deposición de *S. Enteritidis* dentro de los huevos en formación es consecuencia de la colonización de los tejidos reproductivos. La localización inicial de la bacteria dentro del huevo está determinada por la región del tracto reproductivo involucrada en la infección. Aunque se ha documentado una relación epidemiológica única entre *S.*

Enteritidis y la contaminación del contenido de huevo, otros serotipos son capaces de colonizar el tracto reproductivo y llegar al interior del huevo, como por ejemplo *S. Heidelberg* (Gast *et al.*, 2011a). Gantois *et al.* (2008) compararon la capacidad de colonización del tracto reproductivo de gallinas de postura por parte de los serotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Virchow* y *S. Hadar*. Estos autores encontraron que los distintos serotipos colonizan los órganos reproductivos en diferentes grados, siendo *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* los serotipos con mayor capacidad de infección. Sin embargo, una alta frecuencia de infección no siempre está relacionada a una alta frecuencia de contaminación del contenido de huevo (Gast *et al.*, 2011b).

Ensayos experimentales de inoculación oral indican que las salmonelas pueden interactuar con los componentes celulares de los folículos preovulatorios. Los microorganismos transportados por la sangre pueden depositarse cerca de la membrana basal de las células de la teca. Desde ese lugar, la bacteria penetra la membrana basal y la yema invadiendo después las células de la granulosa o migrando entre las células y atravesando la capa perivitelina (Gast y Holt, 2001). Está demostrado que *S. Enteritidis* interactúa con las células granulosas de una manera específica, invadiendo y multiplicándose en estas células; desde ese lugar las bacterias pueden llegar a la yema, atravesando la membrana perivitelina (De Buck *et al.*, 2004). Cogan *et al.* (2004) demostraron que las fimbrias son las encargadas de unirse a la membrana vitelina para alcanzar la yema. Existen niveles altos de nutrientes disponibles para las bacterias en los folículos ováricos, por lo que se esperaría una extensa multiplicación bacteriana en este sitio. Dicha multiplicación resultaría inevitablemente en una degeneración folicular. Sin embargo, este fenómeno no es común en infecciones naturales de gallinas de postura, por lo que se considera que la colonización de *Salmonella* en los folículos no sería una fuente importante de contaminación del huevo, pero este tema se encuentra aún en debate (Gantois *et al.*, 2009).

La infección del oviducto puede ocurrir de manera ascendente desde la cloaca o desde la vagina, con una consecuente infección del istmo y del útero, raramente alcanzando el oviducto superior. Por otro lado, antes de la formación de la cáscara puede ocurrir que, los huevos en formación se contaminen por una infección descendente desde los tejidos del ovario (De Buck *et al.*, 2004). Por lo tanto, dependiendo del sitio de colonización endógena, *Salmonella* puede incorporarse tanto a la clara como a la cáscara y sus membranas. Si bien *Salmonella* ha sido aislada de la clara y de la yema, la mayoría de los autores concuerdan que la clara es siempre la que está más frecuentemente contaminada, lo

que sugiere que el magnum del oviducto es un sitio frecuente de colonización (Gantois *et al.*, 2009).

La interacción entre *S. Enteritidis* y el oviducto juega un rol principal en la contaminación del huevo. *S. Enteritidis* invade las células tubulares glandulares del oviducto por interacción de las fimbrias tipo I y los residuos de manosa presentes en las secreciones del tejido. Gantois *et al.* (2008) demostraron, mediante un estudio *in vitro*, que otros serotipos de *Salmonella* poseen la misma capacidad de invasión, por lo que no es una característica única de *S. Enteritidis*. Por otro lado, estos autores mostraron que tanto *S. Enteritidis* como *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg* sobreviven en la clara de huevo durante 24 horas a 42°C. Este es el tiempo promedio para la formación natural del huevo en el oviducto. En cambio, *S. Virchow* y *S. Hadar* fueron mucho más susceptibles a la actividad antimicrobiana de la clara.

1.5.2 Contaminación del huevo después de la oviposición

Algunos autores afirman que la contaminación fecal después de la oviposición es la principal forma de contaminación de los huevos (Gantois *et al.*, 2009). Otros (De Buck *et al.*, 2004) señalan que la contaminación fecal es menos probable en una gallina sana. Sin embargo, este tipo de contaminación es crítica en relación con la higiene del galpón, el manejo y transporte de los huevos.

Después de la oviposición, el huevo está expuesto a una variedad de áreas contaminadas y una mayor contaminación depende de la presencia de un alto grado de materia orgánica húmeda, incluyendo las excretas, que actúan como una barrera de protección y aporte de nutrientes para la sobrevivencia y desarrollo de *Salmonella* sobre la cáscara. Además, el huevo queda expuesto a una temperatura corporal menor que la del ave, creando de ese modo una presión negativa, lo que permitiría a las bacterias penetrar más fácilmente tanto la cáscara como las membranas, primero a través de los poros que carecen de la protección de la cutícula. A medida que la cutícula se seca y se contrae, los poros quedan más expuestos al pasaje de las bacterias (Howard *et al.*, 2012).

En la etapa inicial de la contaminación horizontal, las bacterias se encuentran localizadas entre la cáscara y las membranas; estas últimas actúan como filtros y representan sólo una barrera temporal para el pasaje hacia el interior del huevo (Messens *et al.*, 2006).

Distintas especies bacterianas parecen tener diferente capacidad para penetrar la cáscara del huevo (Messens *et al.*, 2006). De Reu *et al.* (2006) compararon la capacidad de penetrar la cáscara de siete especies bacterianas aisladas de contenido de huevo. Estos

autores encontraron que *Pseudomonas* sp., *S. Enteritidis* y *Alcaligenes* sp. tienen mayor capacidad para penetrar la cáscara.

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 *S. Enteritidis*. Soria (2012) investigó la presencia de *Salmonella* en 452 muestras de maple, encontrando sólo 5 muestras positivas; los serotipos encontrados fueron *S. Muenchen*, *S. Westhampton*, *S. Agona*, y *S. Enteritidis*.

Una vez dentro del huevo, las bacterias enfrentan un ambiente desfavorable, ya que la clara es rica en lisozima y carece de hierro disponible debido a la presencia de la ovotransferrina (Guard-Peter, 2001). Por otro lado, también existen anticuerpos maternos, que son transferidos al huevo y posteriormente al embrión en desarrollo. La IgY es la principal inmunoglobulina en la yema de huevo, mientras que la IgA e IgM se encuentran principalmente en la clara (Kaspers *et al.*, 1996). Se ha sugerido que al pasar el tiempo, los huevos tienen una pérdida parcial de la integridad de la membrana vitelina y como consecuencia ocurre el paso de nutrientes hacia la clara. Esto desencadena la quimiotaxis de *Salmonella* hacia la membrana vitelina con la subsecuente invasión en la yema. Una vez allí, puede producirse un rápido crecimiento de la bacteria (Van Immerseel *et al.*, 2010).

Debido a la baja incidencia de contaminación del huevo en condiciones naturales y a la labor intensiva que implica examinar un gran número de huevos, no se dispone de suficientes estudios para establecer definitivamente cuál es el principal sitio de contaminación. Sin embargo, es razonable sugerir que debido a que *Salmonella* Enteritidis puede ser aislada de todos los sitios del tracto reproductivo de las gallinas, es posible que con este serotipo, en particular, la contaminación pueda provenir de cualquier parte del aparato reproductor de la gallina (Gantois *et al.*, 2009).

1.6. Detección de *Salmonella* en el laboratorio a partir de muestras avícolas

Para las investigaciones epidemiológicas detalladas es necesario identificar las cepas, y tales investigaciones han descansado tradicionalmente en métodos bacteriológicos y serológicos, en la fagotipificación de algunos serotipos y en los antibiogramas (OIE, 2008). Además, actualmente se han investigado y desarrollado métodos rápidos de detección, en los cuales el tiempo de detección se ha reducido en unas 18 a 24 horas (Mølbak *et al.*, 2006).

Aunque la observación clínica puede sugerir la presencia de la infección por salmonelas, el diagnóstico final depende del aislamiento e identificación del microorganismo. Las muestras para salmonelas paratíficas pueden obtenerse de una variedad de fuentes, principalmente de tejidos, huevos y del ambiente de las granjas. Como muchos de los serotipos de salmonelas paratíficas son altamente invasivos y pueden diseminarse a los órganos internos, pueden tomarse muestras de hígado, bazo, ovarios, oviductos, saco vitelino, corazón etc. Los hisopados cloacales han sido utilizados para evidenciar la colonización intestinal persistente. (Gast, 2008). Entre las muestras ambientales, se incluyen las heces, la basura y el polvo, los barridos o los frotis a partir de las superficies del suelo, los cuales pueden ser el modo más eficaz, en cuanto al coste, de identificar granjas infectadas (OIE, 2008). El alimento es otra muestra de elección, ya que se considera la principal fuente de introducción de salmonelas en la producción (Jones y Richardson, 2004) debido a la presencia de proteínas animales y otros ingredientes contaminados (Rose *et al.*, 1999).

Los órganos de elección para el aislamiento de *S. Pullorum* o *S. Gallinarum* son el hígado, bazo y contenido de ciegos. En pollitos jóvenes es esencial la toma de muestras del saco vitelino. En aves con enfermedad crónica las muestras de elección son óvulos afectados, testículos o el contenido de articulaciones afectadas (Chacana y Terzolo, 2003).

1.6.1. Método de cultivo bacteriológico

Tanto las muestras clínicas como las ambientales son procesadas con un pre-enriquecimiento no selectivo, en el caso que se considere que las salmonelas se encuentran en bajo número o están potencialmente dañadas. Posteriormente, se sigue un enriquecimiento selectivo; luego las muestras se siembran en agares selectivos y diferenciales. Las colonias bacterianas son identificadas como *Salmonella* mediante pruebas bioquímicas y confirmación serológica (Waltman y Gast., 2008). Cuando la enfermedad es aguda, la bacteria puede aislarse fácilmente a partir del cultivo directo mediante improntas de órganos en placas de agar. Es importante señalar que el éxito en la detección de *Salmonella* depende de la elección de un procedimiento de muestreo representativo combinado con un método de cultivo de alta sensibilidad (Chacana y Terzolo, 2003; Carrique-Mas y Davies, 2008).

Existe una gran variedad de medios y condiciones de cultivo para el aislamiento de *Salmonella*, a partir de diferentes tipos de muestra. Sin embargo, es importante señalar que no existe un único método que sea óptimo para todos los tipos de muestras. Encontrar el

mejor método para un tipo particular de muestra requiere efectuar intensos estudios de la literatura disponible y realizar pruebas comparativas entre los diferentes métodos antes de seleccionar una determina técnica de aislamiento. Actualmente, varios de los procedimientos estandarizados disponibles se pueden obtener de una serie de organismos internacionales de normalización, tales como la Organización Internacional de Estandarización (ISO), la Asociación Americana de Salud Pública (APHA), la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), entre otras.

1.6.1. Medios de cultivo para pre-enriquecimiento

El pre-enriquecimiento es el proceso de inoculación de la muestra en un caldo no selectivo y su incubación durante 18-24 h a 35-37 °C. Entre los medios de cultivo utilizados para el pre-enriquecimiento se incluyen el agua de peptona tamponada, el caldo tripteína de soja y el caldo lactosado (Waltman y Gast, 2008). Estos medios permiten que un escaso número de salmonelas se multipliquen sin que mueran por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento, o ayudan a la recuperación de las que presentan daños subletales, como los debidos a la congelación, el calentamiento, la exposición a las sustancias microbidas o a la desecación (OIE, 2008). Entre los medios de cultivo utilizados como medios de pre-enriquecimientos para el aislamiento de *Salmonella* se encuentran:

- ✓ Agua peptona tamponada: es uno de los medios de pre-enriquecimiento más utilizado para el aislamiento de *Salmonella* en un amplio rango de alimentos y el medio de elección en muchos métodos de referencia (Baylis *et al.*, 2000). La presencia de sales fosfato en el medio provee las condiciones adecuadas para la recuperación de las bacterias dañadas en los procesos de preservación de alimentos, tales como calentamiento, desecación o altas presiones osmóticas. El medio contiene peptona como fuente de nitrógeno y cloruro de sodio para mantener el balance osmótico del medio.
- ✓ Caldo tripteína de soja: es un medio general usado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos. Su uso con la adición de sales de hierro se debe a que el hierro en la forma de sulfato ferroso promueve el crecimiento de bacterias Gram-negativas y mejora el aislamiento de *Salmonella* en el contenido de huevo (Cogan *et al.*, 2001).
- ✓ Caldo lactosado: a diferencia del agua peptona tamponada, este medio carece de un sistema de sales fosfato por lo que no puede mantener el pH estable durante la incubación de las muestras. A pesar que la mayoría de las salmonelas son incapaces de fermentar

lactosa, si la muestra contiene microorganismos capaces de hacerlo, se producirá una drástica reducción del pH, afectando a los competidores de las salmonelas (Entis, 2002).

1.6.1.4. Medios de cultivo para enriquecimiento selectivo

El objetivo del paso de enriquecimiento en medios selectivos es reducir la concentración de los microorganismos competidores y, al mismo tiempo, aumentar o mantener estable la población de la bacteria de interés (Entis, 2002). Entre los medios de enriquecimiento selectivo empleados en muestras avícolas se encuentran:

- ✓ Caldos tetracionatos: la fórmula original conocida como Tetracionato Muller Kauffman comprende una mezcla de peptonas de carne y de caseína, sales biliares, carbonato de calcio, tiosulfato de sodio, yodo y el colorante verde brillante. Las sales biliares y el verde brillante inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas, el carbonato de calcio provee un pH alcalino, mientras que el yodo y el tiosulfato de sodio se combinan para la formación del tetracionato. Como este último componente no es estable, para un óptimo desempeño del medio, es recomendable añadir el yodo momentos antes de utilizar el medio (Entis, 2002). Las fórmulas nuevas, como el caldo Tetracionato Hajna o Hajna y Damon ya contienen verde brillante y requieren sólo la adición de una solución de yodo al medio base (Waltman y Gast, 2008). Para evitar la contaminación del género *Proteus* sp. puede resultar necesario agregar novobiocina (Jeffries, 1959).
- ✓ Caldos selenitos: Al igual que los caldos tetracionatos, existe más de una versión de caldo selenito, siendo el medio selenito-cistina el más conocido (Entis, 2002). Aunque los caldos selenito se consideran adecuados para el aislamiento de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, algunos laboratorios no los utilizan debido a su toxicidad para los operadores o porque después de preparados su vida media es corta, por lo que actualmente estos caldos no están siendo muy utilizados. Es más recomendable el uso del caldo Selenito-Cistina que el Selenito F, pues este último es menos estable y más inhibitorio (OIE, 2012).
- ✓ Caldo Rappaport-Vassiliadis: es uno de los medios más comúnmente usados y efectivos para aislar *Salmonella* a partir de muestras ambientales y contenido de huevo (Gast, 2008). El medio se basa en distintos parámetros de selectividad entre los que se incluyen alta presión osmótica, pH ácido ($5,2 \pm 0,2$), colorante verde de malaquita e incubación a 42-43°C (Entis, 2002).

✓ Medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado (MSRV): originalmente las técnicas de enriquecimiento basadas en la movilidad bacteriana eran realizadas en tubos en forma de U. En 1984, Gossens *et al.* reemplazaron los tubos en U por placas de Petri, utilizando caldo Rappaport con el agregado de 3,2 g de agar y reduciendo los nutrientes de la fórmula en un 60%. El método consiste en la siembra de una gota del caldo de pre-enriquecimiento en el centro del medio de cultivo semisólido. Las bacterias móviles crecen radialmente, formando un halo de crecimiento. Si las salmonelas móviles están presentes en la muestra, serán dominantes en el extremo del halo (Busse, 1995) de dónde pueden ser selectivamente aisladas. Actualmente es el medio de elección empleado en la Unión Europea para el monitoreo de salmonelas paratíficas (móviles) en las aves de corral, presente en el anexo D de la norma ISO 6579-2002. La modificación consiste en el uso del MSRV como único medio de enriquecimiento selectivo (Carrique-Mas *et al.*, 2009).

1.6.1.5. Agares selectivos-diferenciales.

Estos medios usualmente 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 la presencia de altas concentraciones de bacterias distintas de *Salmonella* en las muestras ambientales, los medios selectivos-diferenciales deben contribuir a la inhibición previa llevada a cabo por el enriquecimiento selectivo. Muchos de los medios pueden inhibir la mayoría de los coliformes. Sin embargo, los principales problemas son las especies de *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* y *Pseudomonas*. Las colonias de estas bacterias pueden confundirse con *Salmonella* en algunos de los ágares, resultando en altos porcentajes de falsos positivos (Waltman y Gast, 2008). Entre los medios selectivo-diferenciales usados se citan:

✓ Agar Verde Brillante: este medio ha sido suplementado con componentes antimicrobianos para aumentar su selectividad. Entre estos componentes se encuentran la sulfapiridina o sulfadiazina y la novobiocina principalmente para inhibir a las bacterias del género *Proteus*. Las bacterias fermentadoras de la lactosa son verdes. Las colonias de *Salmonella* en este medio usualmente son grandes y de color rosado-pálido (Figura 1.4 A), convexas, transparentes, aunque ante la presencia de colonias fermentadoras de lactosa en su proximidad suelen perder su típica coloración por difusión de acidez en el medio (Waltman y Gast, 2008). Este medio ha sido aplicado para el aislamiento de *Salmonella* en diversos tipos de muestras, como por ejemplo tejidos, huevo, alimento y aire (Gast, 2008).

✓ Agar Mac Conkey (Figura 1.4 B): es inhibidor para los microorganismos no entéricos, diferencia microorganismos fermentadores de lactosa (colonias rosadas) de los no fermentadores de dicho azúcar (colonias transparentes). Es el medio de elección para el cultivo directo de tejidos (OIE, 2008).

✓ Agar EF-18: este medio de cultivo inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y ciertas Gram-negativas, mientras que mejora el crecimiento de *Salmonella*. Las bacterias del género *Salmonella* se diferencian del resto de las enterobacterias por medio de la fermentación de sacarosa y descarboxilación de lisina (Figura 1.4 C). El medio fue desarrollado para una técnica de aislamiento en la cual el caldo de enriquecimiento es filtrado a través de una membrana hidrofóbica, que luego es incubada sobre el agar EF-18 (van der Zee, 2003). Petersen (1997) empleó este medio, previo pre-enriquecimiento en

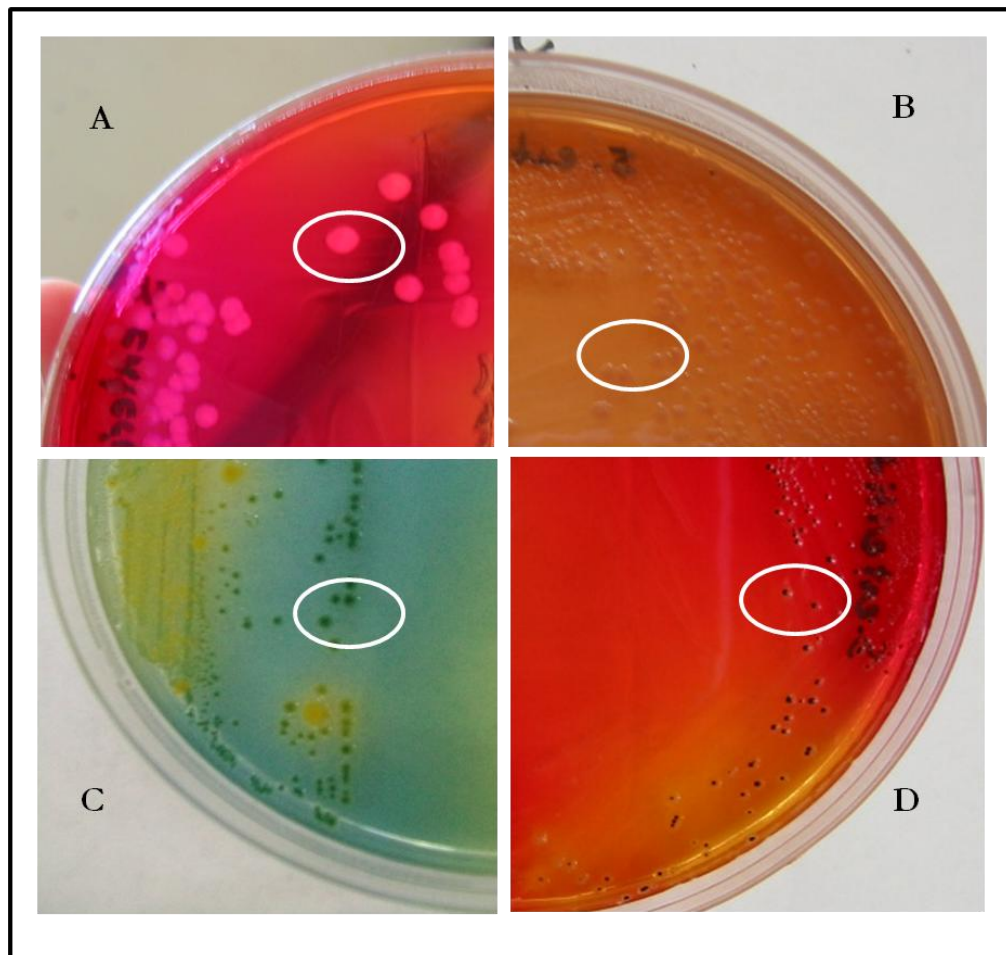


Figura 1.4. Aspecto de colonias de *Salmonella* sp. en diferentes medios agarizados selectivos-diferenciales. A: agar verde brillante. B: agar Mac Conkey. C: Agar EF-18. D: agar XLD.

agua de peptona tamponada y enriquecimiento selectivo en caldo Rappaport-Vassiliadis, para muestras de origen avícola, encontrando una alta sensibilidad para muestras fecales.

✓ Agar Xilosa-lisina-desoxicolato (Figura 1.4 D): el desoxicolato presente en el medio inhibe las bacterias coliformes y permite la dispersión de colonias de *Proteus*, que pueden confundirse con las salmonelas. 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. Tate *et al.* (1990) estudiaron la adición de novobiocina al medio XLD, encontrando un porcentaje de aislamiento de *Salmonella* del 97% en un total de 254 muestras ambientales de origen avícola, aunque se debe considerar que el agregado de este antibiótico disminuye la capacidad del medio para detectar la producción de ácido sulfhídrico. Yuño *et al.* (1995) encontraron que el agregado de novobiocina al medio XLD no inhibió totalmente a algunas cepas de *Proteus* en muestras de materia fecal de aves experimentalmente inoculadas con *Salmonella*.

✓ Agar XLT₄: fue diseñado por Miller *et al.* (1991) por adición de tergitol 4 al medio base xilosa-lisina para el aislamiento de *Salmonella* en muestra de excretas avícolas. El tergitol tipo 4 es un surfactante que inhibe las especies de *Proteus*, *Pseudomonas* y *Providencia* (Yuño *et al.*, 1995). Miller *et al.* (1991) encontraron que el medio provee una buena diferenciación entre *Salmonella* y *Citrobacter*. Actualmente, el medio XLT₄ es recomendado por los métodos de la FDA para el aislamiento de *Salmonella* en muestras ambientales en galpones de producción avícola (FDA, 2008).

✓ Agar Entérico Hektoen: King y Metzger (1968) formularon el agar Hektoen para el aislamiento de microorganismos entéricos. El medio contiene gran cantidad de peptonas para compensar el efecto inhibitorio de las sales biliares. Dispone de dos sistemas de indicadores: (azul de bromotimol y fucsina ácida) de la fermentación de carbohidratos y citrato de hierro como un indicador de la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato. Soria *et al.* (2012) emplearon el agar Hektoen en muestras de clara y yema de huevo inoculadas con diferentes serotipos de *Salmonella*, encontrando que el medio no mostró diferencias significativas de aislamientos con respecto a los obtenidos con el agar XLD.

- ✓ Agar *Salmonella-Shigella*: el colorante verde brillante, las sales biliares y las altas concentraciones de citrato y de tiosulfato del medio inhiben los microorganismos acompañantes. Los iones de hierro y tiosulfato detectan la producción de ácido sulfhídrico. Las bacterias coliformes degradan la lactosa produciendo viraje del indicador rojo neutro (Merck, 2005). Las bacterias que no fermentan la lactosa y que producen sulfuro de hidrógeno como *Salmonella* y *Proteus* forman colonias incoloras con centro negro. En este medio, el crecimiento de bacterias pertenecientes a estos dos géneros tiene el mismo aspecto y por lo tanto ambos pueden confundirse entre sí (Yuño *et al.*, 1995).
- ✓ Agar Rambach: la diferenciación del género *Salmonella* se basa en la acidificación debida a la degradación del propilen-glicol que determina un viraje del indicador de pH y una coloración roja de las colonias. Un indicador cromógeno de la enzima β -galactosidasa permite la identificación por su color azul de las bacterias que lo poseen (Yuño *et al.*, 1995).

Otros medios selectivos-diferenciales: aunque el agar sulfito de bismuto ha sido ampliamente utilizado en muestras clínicas de humanos y recomendado por la FDA y la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para alimentos, carece de la sensibilidad y especificidad de otros medios (Gast, 2008). Yuño *et al.* (1995) encontraron este medio muy inhibitorio para muestras de hígado, bazo, vesícula biliar y saco vitelino de pollos inoculados con *Salmonella* sp. Waltman y Gast (2008) citan los medios Agar Lisina Hierro modificado (similar al agar verde brillante con novobiocina y al XLT₄ en términos de recuperación) y al agar Miller-Mallinson. Este último medio contiene celobiosa, lactosa, manitol, trealosa y proteínas, que favorecen el crecimiento de *Salmonella* frente a otros microorganismos entéricos (Miller y Mallinson, 2000).

1.6.1.6. Confirmación de género: pruebas bioquímicas

El crecimiento de colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* sp. en los agares selectivos-diferenciales permite seleccionar las mismas para su posterior siembra en medios de cultivo para realizar distintas pruebas bioquímicas (Figura 1.5). El uso combinado del agar hierro tres azúcares (TSI) o agar Kligler (agar hierro dos azúcares) junto al agar lisina hierro (LIA) es generalmente suficiente para la identificación de la mayoría de las colonias sospechosas de *Salmonella*. Al menos tres colonias claramente separadas se transfieren a estos medios (Waltman y Gast, 2008). En el caso del TSI la mayoría de las salmonelas producen reacción alcalina (rojo) en el bisel y ácida (amarillo) en el fondo del tubo con producción de gas y H₂S que a menudo oscurece la reacción ácida.

En el agar lisina hierro, *Salmonella* muestra descarboxilación de la lisina, con reacción alcalina en el bisel y alcalina en el fondo del tubo. La prueba de LIA es útil para diferenciar *Salmonella* de otras bacterias intestinales, tales como *Citrobacter* sp. y *Proteus* sp., ambas similares en TSI (Waltman y Gast, 2008). En el caso de las aves, en donde predominan las bacterias del género *Proteus*, el agar urea (*Proteus* es positivo y *Salmonella* es negativa) es una prueba que permite diferenciar colonias de *Proteus* que son idénticas a las de *Salmonella* en algunos de los agares (*Salmonella-Shigella*, XDL, XLDT), pues ambas son lactosa negativas y productoras de sulfhídrico. Para la confirmación bioquímica, además de las pruebas bioquímicas comunes a todas las salmonelas, deben realizarse pruebas específicas que permiten distinguir las biovariedades, como la prueba de acidificación de tartrato de Jordan (Chacana y Terzolo, 2003). La prueba en agar citrato, se utiliza para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono. Esto conduce a la alcalinización del medio con cambio de color del indicador de pH, originando un color azul profundo (Merck, 2005).

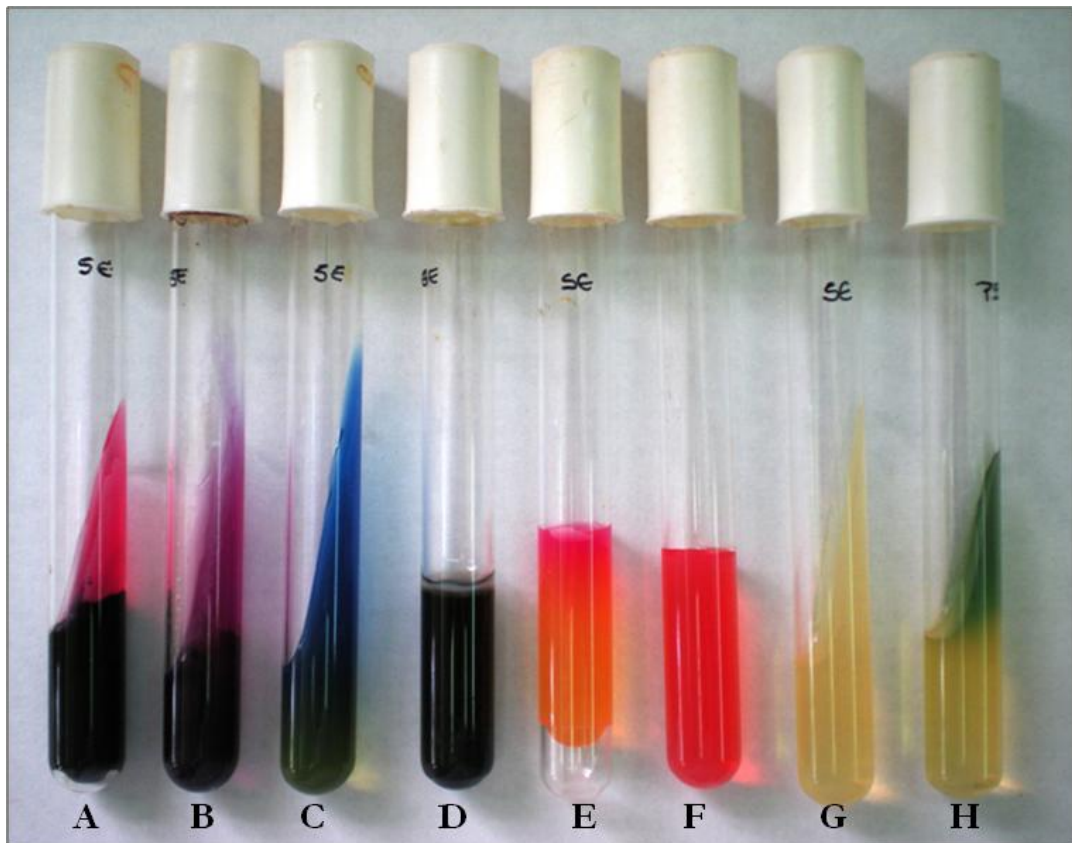


Figura 1.5. Pruebas bioquímicas para *Salmonella* de tipo móvil. A: agar hierro tres azúcares. B: agar lisina hierro. C: agar citrato de Simmons. D: medio Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM). E y F: agar Tartrato de Jordans, con *S. Enteritidis* y control sin sembrar, respectivamente.

Los medios G y H corresponden a agar fenilalanina sembrados con *S. Enteritidis* (G) y *Pseudomonas* sp (H).

El agar SIM (sulfhídrico, indol, movilidad) pone de manifiesto la movilidad, la formación de sulfuro de hidrógeno y la producción de indol (Caffer y Terragno, 2001). La movilidad se indica por la presencia de una turbidez difusa alrededor del punto de siembra; si las bacterias son inmóviles, el crecimiento ocurre sólo en la línea de punción. La formación del sulfuro de hierro se observa por un color negro en el área de crecimiento. Para la formación de indol, el medio es cubierto con el reactivo de Kovács. Éste genera un color rosado lo que indica una reacción positiva. La prueba de la β -galactosidasa demuestra la presencia o ausencia de esta enzima utilizando el compuesto orgánico *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (Mac Faddin, 1980).

Por último, la prueba de la fenilalanina-desaminasa determina la capacidad del microorganismo de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico, el que reacciona con el cloruro férrico para formar un compuesto de color verde. Las salmonelas son negativas a esta prueba por lo que pueden utilizarse bacterias del género *Pseudomonas* como control positivo (Figura 1.5)

1.6.1.7. Serotipificación: confirmación serológica

Clásicamente, los aislamientos de *Salmonella* se clasifican e identifican mediante métodos fenotípicos, tales como perfiles bioquímicos, serotipificación y fagotipificación. La serotipificación es un método usado desde hace más de 80 años y es la base de la actual clasificación de las serovariedades de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Wattiau *et al.*, 2011). Actualmente, se reconocen más de 2.400 serovariedades de *S. enterica* basadas en las diferencias antigénicas del lipopolisacárido O (LPS, antígeno somático O), en la fase 1 y 2 del antígeno flagelar H (H1 y H2) y en el antígeno capsular. Dentro de este último, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*; se lo encuentra sólo en 3 serotipos: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. Dublin*. En base al antígeno flagelar, *Salmonella* puede ser bifásica (expresa H1 y H2) o monofásica (expresa el antígeno H1). Por convención, los antígenos identificados en una determinada cepa se presentan en una fórmula antigénica, en la cual, el nombre del serotipo es seguido por los antígenos somáticos O, separados por dos puntos de los flagelares (Wattiau *et al.*, 2011). Por ejemplo, la fórmula antigénica 4, 5,12 (O): i (H1): 1,2 (H2) es la denominación de la serovariedad bifásica *S. Typhimurium*; 1,9,12 (O): g,m (H1): - identifica a la serovariedad monofásica *S. Enteritidis* (Hong *et al.*, 2008). Sobre la base de los componentes antigénicos O y flagelares H, se ha establecido lo que se

denomina el esquema de Kauffmann-White, que agrupa a todos los serotipos conocidos (Caffer y Terragno, 2001).

1.6.2. Métodos rápidos

Durante las últimas décadas, ha surgido el interés por los métodos rápidos. Los mismos pueden definirse como cualquier método o sistema que reduce el lapso de tiempo para obtener el resultado de la prueba de identificación. Además de reducir el tiempo, el objetivo es poder procesar el mayor número de muestras posible, automatizando el trabajo en el laboratorio (Jasson *et al.*, 2010).

Algunos métodos rápidos son:

- ✓ Ensayo ELISA: esta técnica se basa en la unión de anticuerpos marcados a los antígenos de *Salmonella*. El nivel de antígenos presentes se determina por conversión enzimática de un sustrato, comúnmente con cambio de color, que puede ser leído visualmente o por espectrofotómetro. Los reactivos están unidos a una matriz sólida como una placa de microtitulación.
- ✓ Separación inmuno-magnética: a partir de las muestras de pre-enriquecimiento, los microorganismos son capturados por perlas que llevan en su superficie anticuerpos específicos para *Salmonella* (Jeníková *et al.*, 2000). Estas perlas de poliestireno tienen un diámetro entre 2,8 y 4,5 μm . Durante la fabricación de las perlas, pequeñas partículas de gamma- Fe_2O_3 son distribuidas homogéneamente dentro del volumen de las perlas. Las disponibles en el mercado llevan anticuerpos poli o monoclonales y algunas en particular utilizan una mezcla de ambos, lo cual permite la adhesión de más de 1.400 serotipos de *Salmonella* (Safarik *et al.*, 1995). Posteriormente, los microorganismos adheridos a las perlas son capturados y separados del medio de cultivo mediante un dispositivo que contiene imanes (Jeníková *et al.*, 2000). El uso de la separación inmuno-magnética, previo al cultivo en agares selectivos-diferenciales, ha logrado detectar en mucho menor tiempo frecuencias de contaminación de *Salmonella* iguales o superiores a las detectadas por técnicas tradicionales de enriquecimiento selectivo. Esta técnica se puede aplicar en muestras de carne de pollo, tejidos, hisopados cloacales y cáscaras de huevo (Gast, 2008).
- ✓ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La técnica de PCR es altamente sensible para la detección de ADN (Fredericks y Relman, 1999). La región que va a

ser amplificada es específica para los cebadores (primers) seleccionados (Jasson *et al.*, 2010). Rahn *et al.* (1992) utilizaron cebadores seleccionados a partir de la secuencia del gen *invA* y desde entonces éstos han sido usados en combinación con otros en PCR múltiples para la detección de *Salmonella* junto a otros patógenos. El gen *invA* está implicado en la capacidad del microorganismo para invadir las células epiteliales, y está presente en la mayoría de los serotipos de *Salmonella* (Galán *et al.*, 1992). Existen numerosos juegos de primers cuyos sitios de amplificación son distintos del gen *invA* y, a través de los cuales, no sólo puede detectarse la presencia del patógeno, sino también la de otros genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Beutlich *et al.*, 2011). Por ejemplo, las cepas de *S. Enteritidis* con frecuencia portan plásmidos que codifican un operon de virulencia, llamado *spv* (por sus siglas en inglés “*Salmonella* plasmid virulence”) que consta de cinco genes *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD*. Estos genes pueden transferirse horizontalmente y movilizarse por medio de plásmidos conjugativos entre las cepas de *Salmonella* (Amini *et al.*, 2010). Diferentes trabajos han sido publicados basando la detección de *Salmonella* por PCR en estos genes de virulencia (Lampel *et al.*, 1996; Dias de Oliveira *et al.*, 2003; Amini *et al.*, 2010). Agrón *et al.*, (2001) diseñaron un par de cebadores específicos para *S. Enteritidis*, estudiando distintos fragmentos de restricción del ADN presentes en dicho serotipo y ausentes en otras bacterias. Estos cebadores llamados *sdf* I (por sus siglas en inglés “*Salmonella* Different Fragment”) fueron útiles para la detección de aislamientos clínicos y ambientales de *S. Enteritidis*. Por otro lado, Lim *et al.* (2003) desarrollaron una PCR múltiple para la detección de *S. Typhimurium*. Estos autores utilizaron tres pares de primers, diseñados para detectar los antígenos O4, Hi y H:1,2 codificados por los genes *rflJ*, *fliC* y *fliB*, respectivamente. Los productos amplificados con este set de cebadores fueron altamente específicos para *S. Typhimurium*. Por otro lado, Kang *et al.* (2011) han desarrollado una PCR doble, que permite la identificación diferencial de los biovars Gallinarum-Pullorum. Estos investigadores diseñaron cebadores para la detección de regiones polimórficas de los genes *glgC* y *speC*. Mediante estos cebadores lograron diferenciar 53 cepas de *S. Gallinarum* y 21 cepas de *S. Pullorum* con un 100% de sensibilidad. En la misma línea de trabajo, Kang *et al.* (2012) desarrollaron una PCR triple basada en su trabajo anterior (Kang *et al.*, 2011), con el cual plantean la diferenciación de las cepas de *S. Gallinarum* salvajes de la cepa vacunal 9R.

1.6.3. Métodos serológicos

Pueden establecerse pruebas serológicas para determinar la presencia de las bacterias causantes de la enfermedad en un grupo de aves. Sin embargo, es necesario confirmar la enfermedad aislando los microorganismos. Dentro de las pruebas serológicas, se encuentran (OIE, 2008):

- a) Prueba rápida de aglutinación de sangre entera: se puede utilizar en condiciones de campo para detectar tanto *S. Pullorum* como *S. Gallinarum*. Para esta prueba se dispone comercialmente de antígenos bacterianos teñidos, que se colocan junto a una gota de sangre. La aglutinación fácilmente visible del antígeno en unos dos minutos indica una reacción positiva.
- b) Prueba de seroaglutinación: se lleva a cabo de la misma manera que la anterior con la excepción de sustituir la sangre entera por suero.
- c) Prueba de aglutinación en tubo: el suero se utiliza a una dilución inicial de 1/25 obtenida mezclando 0,04 ml de suero con 1,0 ml de antígeno. La lectura se realiza luego de una incubación a 37° ó 50°C durante 18-24h.
- d) Prueba de la microaglutinación: es similar a la aglutinación en tubo, pero se requieren volúmenes menores, ya que se realizan en placas de microtitulación.

Como *S. Enteridis* posee el mismo antígeno somático del grupo D que *S. Pullorum/Gallinarum*, la prueba de sangre completa para *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* y otras relacionadas pueden utilizarse en el diagnóstico de la infección, aunque la sensibilidad es baja (OIE, 2008). El problema de las pruebas serológicas es que en las infecciones subclínicas puede no producirse un nivel de anticuerpos detectable (Gast, 2008). Las infecciones por salmonelas paratíficas también pueden detectarse utilizando ensayos de ELISA. Se han desarrollado diferentes ensayos, basados en anticuerpos que reconocen diferentes partes del lipopolisacárido O (Brooks *et al.*, 2012), flagelos o proteínas de la membrana externa (Gast, 2008).

1.7. Bioseguridad e identificación de factores de riesgo

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* dentro de las granjas. Cualquier factor que predisponga a la población de animales a la presencia de enfermedades, se denomina factor de riesgo.

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, los beneficios (USDA, 2006).

Un buen plan de bioseguridad es como una cadena: 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:

1. Definir los objetivos y las responsabilidades
2. Asignar responsabilidades a individuos
3. Proveer supervisión a los individuos asignados con esas responsabilidades.
4. Aíslar la granja para prevenir la entrada o salida de una enfermedad infecciosa.
5. Puede ser ajustado a medida que las condiciones locales y amenazas de enfermedades cambian regionalmente (Gernat, 2004).

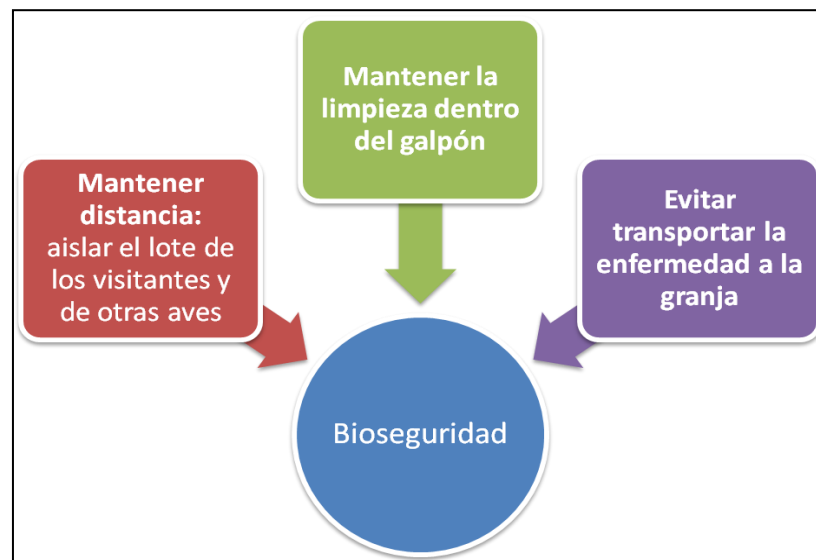


Figura 1.6. Algunas de las medidas de bioseguridad para granjas de producción avícola.

Entre las medidas de bioseguridad (Figura 1.6) 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:

- a. Restringiendo 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 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 conforman 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. La aplicación de estos procedimientos pueden resultar en un costo-beneficio para alcanzar el objetivo de reducir el impacto de las enfermedades tanto de importancia veterinaria como en salud humana (Lister, 2008).

1.8. Micotoxinas

Durante los siglos XIX y XX se centró la atención en la capacidad de los hongos para producir fermentaciones tanto en medios líquidos como sólidos y muchos investigadores reconocieron una gran cantidad de “metabolitos secundarios” producidos por estos microorganismos. Debido a que algunos de los productos de estas fermentaciones eran consumidos por el hombre, se desarrolló cierto interés sobre ellos. Con el descubrimiento de la penicilina por parte de Alexander Fleming y el desarrollo de los antibióticos, muchos investigadores incluyeron animales en sus estudios de toxicidad. El hecho que algunos de los metabolitos secundarios eran tóxicos para los animales fue el primer indicio en la comunidad científica de que los hongos producían toxinas capaces de causar enfermedad en el hombre y los animales. Una mejor comprensión acerca de esta toxicidad se desarrolló con los estudios sobre el almacenamiento y deterioro de los granos debido a la presencia fúngica (Richard, 2007).

En el mundo cambiante de hoy, la inocuidad alimentaria continúa siendo una necesidad humana básica. Garantizar la inocuidad de los alimentos ha sido un tema prioritario de acción nacional e internacional en los últimos años. Entre los contaminantes químicos, la contaminación de los alimentos y piensos por micotoxinas es una de las fuentes importantes de enfermedades transmitidas por alimentos (WHO, 2002).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos que crecen comúnmente en alimentos y cereales. Estas toxinas pueden causar una variedad de efectos en humanos y animales, desde respuestas alérgicas hasta inmunosupresión y cáncer. Se desconoce el número total de micotoxinas, pero se estima que los metabolitos tóxicos de origen fúngico podrían contarse por miles. Sin embargo, el número conocido de micotoxinas involucrado en enfermedades es considerablemente menor. Dependiendo de la definición usada y teniendo en cuenta que la mayoría de las toxinas fúngicas se agrupan en familias de metabolitos químicamente relacionados, actualmente se reconocen como micotoxinas unos 300 a 400 compuestos (Bennet y Klich, 2003; CAST, 2003). Las principales clases de micotoxinas son las aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenonas, ocratoxina A y los alcaloides del ergot. En muchos casos, las micotoxinas se forman en el campo durante la estación de crecimiento. Sin embargo, también se forman o aumentan durante la cosecha y el almacenamiento de los granos. Tanto la disponibilidad de agua para el crecimiento del hongo y la temperatura ambiental son los factores más importante en el proceso de producción de las micotoxinas (CAST, 2003).

Aunque un nivel bajo de micotoxinas pueda estar presente en los alimentos, diversas condiciones tales como clima inusual, daño por insectos, cultivo y cosecha inadecuada pueden llevar a altos niveles de micotoxinas en los cereales y producir severas enfermedades (Wu, 2004). Además de los riesgos para la salud, la contaminación por micotoxinas también puede reducir el precio de los cereales. En el caso de los países en desarrollo, el impacto económico y en la salud por causa de las micotoxinas es mucho más severo. En estas naciones, muchos individuos no sólo sufren de desnutrición sino también se encuentran expuestos a altos niveles de micotoxinas en su dieta. Mientras que las naciones industrializadas poseen la infraestructura para monitorear la calidad de su alimento, las naciones en desarrollo carecen de métodos e infraestructura para proteger a sus ciudadanos de los alimentos contaminados (Wu, 2004).

La formación de las micotoxinas en la naturaleza es un problema global. Sin embargo, en ciertas áreas geográficas (Tabla 1.2), algunas micotoxinas se producen en mayor cantidad que otras (Akande *et al.*, 2006).

Tabla 1.2. Ocurrencia geográfica de las micotoxinas.

Región	Micotoxinas
Oeste de Europa	Ocratoxina, vomitoxina, zearalenona
Este de Europa	vomitoxina, zearalenona
América del Norte	Ocratoxina, vomitoxina, zearalenona, aflatoxinas
América del Sur	Aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, vomitoxinas, toxina T-2
Africa	Aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona
Asia	Aflatoxinas
Australia	Aflatoxinas, fumonisinas

Fuente: Akande *et al.*, 2006

1.8.1. Micotoxinas en avicultura

El análisis micológico y micotoxicológico del alimento usado para la nutrición en la producción avícola ha demostrado ser un tema fundamental a lo largo de los años. Las micotoxinas usualmente ingresan al animal a través del consumo de alimento contaminado. La enfermedad resultante de esta ingestión por exposición a las micotoxinas se denomina micotoxicosis (CAST, 2003). Uno de los problemas fundamentales es que el alimento contaminado contiene una variedad de micotoxinas en distintas cantidades, por lo que se

manifiestan diferentes efectos tóxicos (Jakić Dimić *et al.*, 2009). Los trabajos referidos a contaminación fúngica en alimentos para aves muestran que los destinados a pollos parrilleros, son los que presentan mayor porcentaje de contaminación, lo cual es consecuencia de la mayor proporción de granos en este tipo de raciones (Bueno *et al.*, 2001).

Las micotoxinas más importantes para la avicultura incluyen las aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, citrinina, fumonisinas y los tricotecenos toxina T-2 y vomitoxina o deoxinivalenol (DON) (Bueno *et al.*, 2001). La moderna micotoxicología comenzó con el descubrimiento de las aflatoxinas, luego de la pérdida de un gran número de animales en Inglaterra en 1961, atribuida al consumo de harina de maní incluida en la dieta (Richard, 2007). En ese momento, las investigaciones revelaron que la harina de maní contenía una sustancia tóxica producida por la especie *Aspergillus flavus* (Marth, 1990). Hoy en día se sabe que estas micotoxinas pueden ser producidas por tres especies más de *Aspergillus*: *A. parasiticus*, *A. nomius*, y *A. pseudotamari* (CAST, 2003).

Estructuralmente las aflatoxinas son derivados difuranocumarínicos, fluorescentes bajo luz ultravioleta (Rawal *et al.*, 2010). Las cuatro aflatoxinas principales se conocen como B₁ (Figura 1.7), B₂, G₁ y G₂; “B” y “G” hacen referencia del inglés a los colores fluorescentes azul (Blue) y verde (Green) producidos por estos compuestos bajo luz UV en la cromatografía de capa fina (Bennet y Klich, 2003). La aflatoxina M₁ es el metabolito hidroxilado de la aflatoxina B₁ y proviene del metabolismo de algunos animales, encontrándose normalmente en la leche y la orina. Las aflatoxinas se pueden encontrar como contaminantes naturales en los cereales (especialmente en el maíz, trigo, sorgo y arroz), subproductos y toda una serie de alimentos; la enfermedad producida por el consumo de alimento contaminado por estas toxinas se denomina aflatoxicosis (CAST, 2003; Gimeno y Martins, 2011).

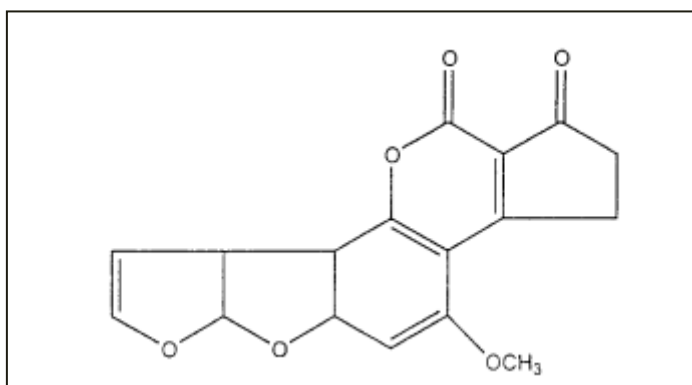


Figura 1.7. Estructura química de la aflatoxina B₁ (Bennet y Klich, 2003).

Químicamente, las ocratoxinas son di-hidro-isocumarinas producidas por especies de *Penicilium* sp. y *Aspergillus* sp. (Figura 1.8). La ocratoxina A es la principal dentro de este grupo y se ha detectado en diversos cereales como trigo, cebada, arroz y sorgo. Se encuentra entre las micotoxinas más tóxicas para la producción avícola.

Hamilton *et al.*, (1982) describieron episodios de ocratoxicosis en pavos, gallinas de postura y pollos parrilleros. Las infecciones en pavos causaron mortalidad, nefrotoxicidad y disminución en el consumo de alimento; en tanto en gallinas ponedoras se produjo reducción de la postura y calidad de la cáscara de los huevos. En infecciones experimentales, las ocratoxinas causan principalmente daño renal, afectando también las funciones hepáticas, inmunológicas y hematopoyéticas (Hoerr, 2003).

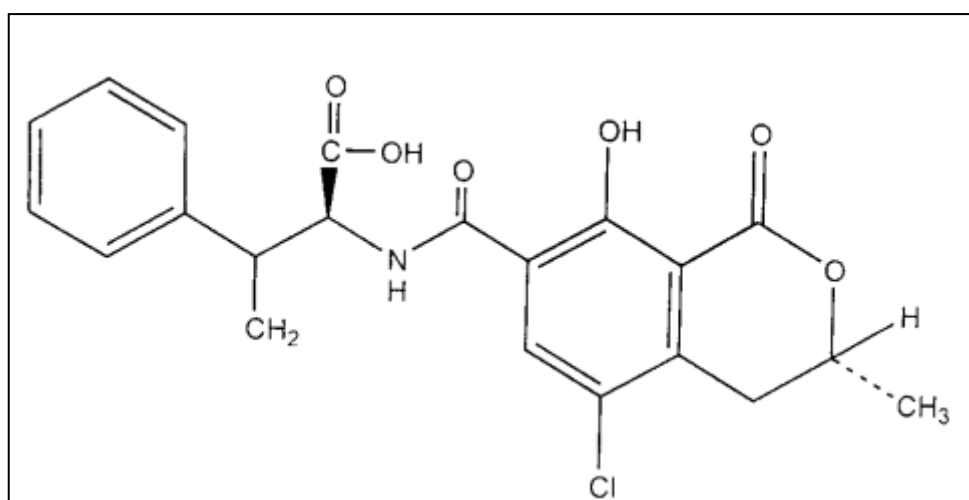


Figura 1.8. Estructura química de la ocratoxina A. Fuente: Bennet y Klich, 2003.

La zearalenona es un metabolito secundario de *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) (Bennet y Klich, 2003). Posee actividad estrogénica, resultado de su similitud con el 17- β -estradiol, principal hormona femenina. Su estructura química se muestra en la Figura 1.9. Los estudios acerca de micotoxicosis causadas por la zearalenona en pavos, pollitos Leghorn y perdices indican una resistencia relativa a la micotoxina en comparación a lo que ocurre en cerdos (Hoerr, 2003). En pollitos Leghorn, se observó un aumento de peso en la bolsa de Fabricio (Speers *et al.*, 1971). Por otro lado, los pollos parrilleros fueron altamente tolerantes a la zearalenona, con lesiones como disminución en el peso de los testículos y leucopenia (Allen *et al.*, 1981; Chi *et al.*, 1980). Estudios recientes indican que a nivel de los linfocitos, la citotoxicidad de la zearalenona ocurre por un desequilibrio en la homeostasis del calcio y una acidificación intracelular en los linfocitos (Wang *et al.*, 2012).

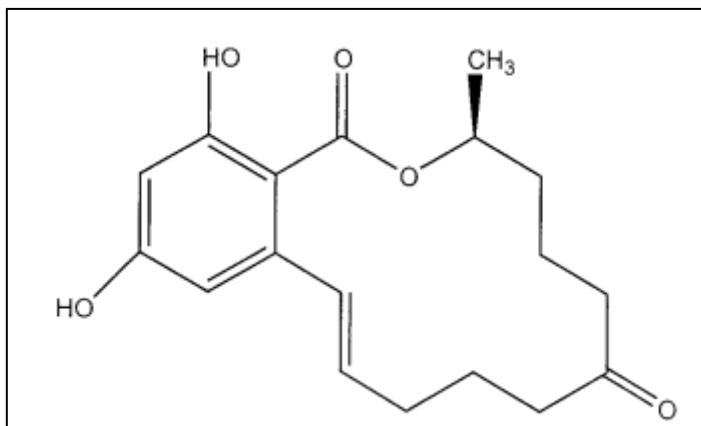


Figura 1.9. Estructura química de la zearalenona (Bennet y Klich, 2003)

La citrinina es un contaminante natural del maíz, arroz y otros granos de cereales producidos por especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Fue purificada a partir de *Penicillium citrininum* en 1931 y sus propiedades antibióticas sobre estafilococos y otras bacterias se conocieron antes que su capacidad nefrotóxica (Hoerr, 2003). La citrinina causa diuresis en las aves de corral, ya que actúa directamente sobre el riñón alterando el proceso de transporte tubular. Es característico el aumento en el flujo urinario y un incremento en la excreción de potasio, sodio e iones fosfato (Glahn y Wideman, 1987). Su estructura química se muestra en la Figura 1.10.

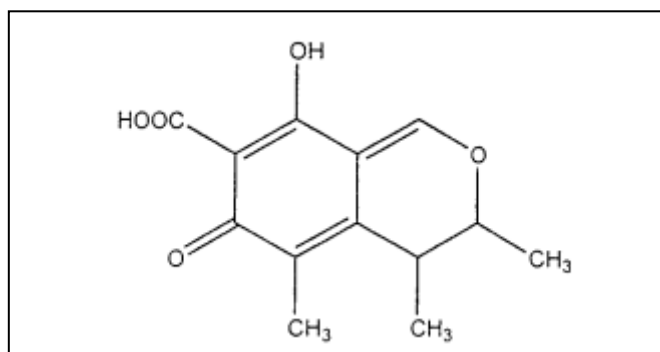


Figura 1.10. Estructura química de la citrinina (Bennet y Klich, 2003)

Las fumonisinas son metabolitos secundarios producidos por distintas especies de *Fusarium*. Fueron descritos y caracterizados por primera vez en 1988. La fumonisina B₁ (Figura 1.11) es la más comúnmente encontrada (Bennet y Klich, 2003), si bien existen también la A₁, A₂, B₂, B₃ y B₄. El modo de acción está relacionado con el bloqueo de la síntesis de esfingolípidos, por lo que afecta la integridad de las membranas celulares y el transporte de iones a través de las células (Pires Rosa y Santurio, 2005). Los principales

signos clínicos de intoxicación por fumonisinas en pollos son ascitis, congestión y edema renal, diarrea, aumento relativo del peso del hígado y mortalidad (Rauber *et al.*, 2012). Henry *et al.* (2000) estudiaron los efectos de la fumonisina B₁ en pollos de engorde, incorporando fumonisina B₁ en concentraciones hasta 80 mg/kg en la dieta; todos los órganos analizados (hígado, riñón, bazo y bolsa de Fabricio) no se vieron afectados macroscópicamente con las concentraciones usadas por estos autores. Sin embargo, ellos encontraron aumentos de la relación glutamato oxaloacetato amino-transaminasa/aspartato aminotransferasa en suero en las aves alimentadas con fumonisina, lo que sugiere un real daño hepático a estos niveles de intoxicación.

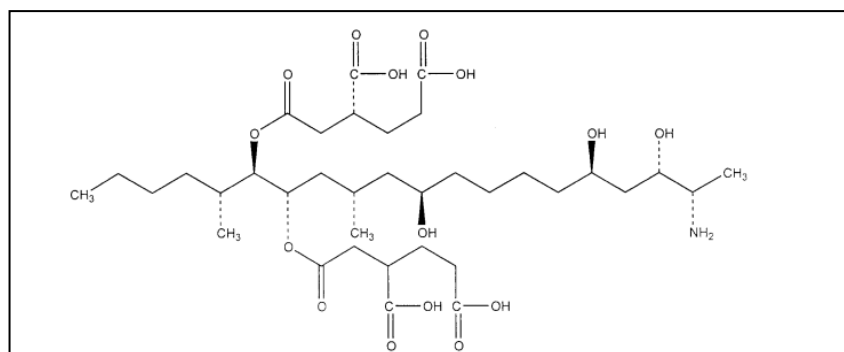


Figura 1.11. Estructura química de la fumonisina B₁ (Bennet y Klich, 2003)

Los tricotecenos se clasifican como macrocíclicos y no macrocíclicos, dependiendo de la presencia de un éster macrocíclico o un enlace éster-éter entre el carbono 4 y 15 (Bennet y Klich, 2003). La exposición de las aves de corral a los tricotecenos ocurre probablemente con el grupo no macrocíclico (Hoerr, 2003). Estos tricotecenos, a su vez, pueden subdividirse en dos grupos: los tipo A, que incluyen a la toxina T-2 y los tipo B, entre los que se incluye al DON (Bennet y Klich, 2003). La toxicidad crónica de los tricotecenos se caracteriza por anorexia, reducción del peso y eficiencia nutricional, cambios neuroendocrinos y efectos inmunológicos (Larsen *et al.*, 2004).

1.8.2. Aflatoxicosis y producción avícola

La importancia de las aflatoxinas en aves se debe no sólo porque su presencia es frecuente sino también por su alto potencial tóxico en las aves de producción (Pires Rosa y Santurio, 2005). Se sabe que las aves son extremadamente sensibles a la aflatoxina B₁, respondiendo a dosis tan bajas como 15-30 µg/kg (Rawal *et al.*, 2010).

Las aflatoxinas son principalmente hepatotóxicas, siendo la aflatoxina B₁ la más perjudicial en animales. La susceptibilidad varía de acuerdo a la edad, raza, dosis y estado nutricional. Además, las aflatoxinas disminuyen la productividad del ave a través de daño renal e inmunológico (Martínez de Anda *et al.*, 2010). En brotes de aflatoxicosis, una de las características más destacadas es la mala absorción del alimento, lo que se manifiesta por la presencia de partículas mal digeridas de alimento balanceado en las excretas de las aves, fenómeno asociado con esteatorrea o aumento de la excreción de lípidos. La esteatorrea presente en la aflatoxicosis puede ser severa, con incremento de hasta diez veces del contenido de grasa en las heces. En pollos de engorde, la esteatorrea está acompañada por una reducción en las actividades específicas y totales de la lipasa pancreática, principal enzima digestiva de las grasas y por la reducción de las sales biliares necesarias tanto para la digestión como para la absorción de grasas, llevando a esteatosis hepática (hígado graso). También se pueden observar palidez de las mucosas y patas en pollos de engorde y gallinas ponedoras que reciben alimento balanceado contaminado con aflatoxinas. Esta pigmentación deficiente se debería a la menor absorción, reducción en el transporte y deposición tisular de los carotenoides de la dieta, siendo la aflatoxicosis identificada como “síndrome del ave pálida” (Mallmman *et al.*, 2007).

El diagnóstico de los trastornos causados por las aflatoxinas sobre la producción de huevos es posible solamente luego de algunos días o semanas. La presencia de folículos preovulatorios formados antes del consumo de la micotoxina en el tracto reproductivo de las aves justifica la respuesta tardía. La reducción de la producción de huevos está precedida por la reducción en los niveles sanguíneos de proteínas y lípidos. Cuando las gallinas ponedoras consumen una dieta que contiene 5 mg/kg de aflatoxinas durante 4 semanas pueden presentar disminución en la producción de huevos a partir del octavo día, llegando a una reducción de la producción del orden del 35% una semana después de que fue retirada la micotoxina de la dieta. Además de la merma en la producción de huevos, la aflatoxicosis también induce a la reducción del tamaño de los huevos, así como a la disminución proporcional en el tamaño de las yemas, debido a los daños causados en la síntesis proteica y lipídica. A pesar de ello, la deposición de calcio en la cáscara de los huevos en sí misma no se ve afectada. La resistencia de la cáscara aumenta cuando las aves consumen aflatoxinas, ya que la disminución en la cáscara de esos huevos no tiene la misma proporción que la que ocurre en la clara y en la yema. Este aumento del espesor de la cáscara puede afectar la eclosionabilidad, debido a una reducción de los intercambios gaseosos entre el embrión y el medio ambiente de la incubadora (Mallmman *et al.*, 2007).

La mortalidad embrionaria en huevos de aves reproductoras intoxicadas con aflatoxinas ocurre porque estas sustancias, luego de ser biotransformadas en el hígado, tienen como uno de los principales metabolitos a la aflatoxina M₁, que es eliminada del organismo a través de la yema. Además, la propia aflatoxina B₁ y el aflatoxicol también se pueden encontrar en la yema a partir de las 24 horas posteriores a la ingestión de aflatoxinas. En casos de aflatoxicosis, los picos de mortalidad embrionaria ocurren en el tercio final de la incubación, pues los metabolitos de las aflatoxinas están concentrados en la yema, la que recién es utilizada por el embrión como fuente energética durante ese período de la incubación (Mallman *et al.*, 2007).

La aflatoxicosis está fuertemente asociada con un aumento a la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. En pollos, las aflatoxinas aumentan la susceptibilidad o severidad a la coccidiosis, enfermedad de Marek, salmonelosis y hepatitis a cuerpos de inclusión (Hoerr, 2003). Los efectos que las toxinas ejercen sobre el complemento, el interferón y las concentraciones de las proteínas séricas son básicamente resultantes de los daños hepáticos que ocasionan y de la disminución en la producción de proteínas. Además de comprometer la formación del interferón y el complemento, se sabe que las aflatoxinas disminuyen la capacidad fagocítica de los macrófagos y la migración de linfocitos y otros leucocitos. Adicionalmente, causan aplasia del timo y una disminución significativa del peso de la bolsa de Fabricio. De esta manera, se afecta la inmunidad celular (linfocitos T, incluyendo tanto las células T colaboradoras) y humoral. Distintos procesos inmunes, asociados con ciertos factores humorales no específicos, se ven alterados por la capacidad de las aflatoxinas de interferir con la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que la actividad del complemento disminuye tanto en aves de corral como cerdos (Robens y Richard, 1992).

1.8.3. Aflatoxinas y su implicancia en salud humana

Las personas están expuestas a las micotoxinas a través de distintas rutas, tales como ingestión (el medio mas importante de exposición), contacto e inhalación (CAST, 2003). La ingestión puede ocurrir través del consumo de productos vegetales contaminados o de bio-productos como huevos, hígado y leche (Santos Chona, 1999).

Una vez que la micotoxina ha sido ingerida, la toxina puede afectar directamente el órgano diana, o metabolizarse a una forma activa intermedia y luego ejercer sus efectos tóxicos. La micotoxicosis puede caracterizarse como aguda o crónica. La toxicidad aguda generalmente tiene un inicio y respuesta rápida, mientras que la toxicidad crónica se caracteriza por una exposición a dosis bajas durante un largo período de tiempo, resultando

en cáncer y otros efectos generalmente irreversibles. Otras enfermedades pueden aparecer cuando la micotoxina interfiere con el proceso inmune, volviendo al paciente más susceptible a enfermedades infecciosas (CAST, 2003).

La aflatoxicosis aguda en humanos es rara. El riesgo más grande de las aflatoxinas para los humanos es generalmente el resultado de una exposición crónica. Estudios epidemiológicos han mostrado una fuerte correlación positiva entre los niveles de aflatoxinas en la dieta y la incidencia de carcinoma hepatocelular que puede agravarse en presencia del virus de la hepatitis B, en algunas partes del mundo. Conjugados aflatoxina-ADN y Aflatoxina-albumina, como así también diversos metabolitos (AFM₁), han sido detectados en suero, leche y orina de pacientes afectados (Chu, 2006).

No se sabe exactamente cual es el nivel tóxico de aflatoxina para consumo humano, especialmente la tipo B₁. En personas intoxicadas se han visto rangos desde 100 mg/kg hasta 20.000 mg/kg. Desde 1976, la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer ha recopilado evidencia acerca de las aflatoxinas y sus efectos en la salud, por lo que incluyó a la aflatoxina B₁ en la lista de sustancias cancerígenas para humanos. Esto fue fundamentado por estudios epidemiológicos realizados en Asia y África, a través de los cuales se demostró una asociación entre los niveles de aflatoxinas en la dieta y el cáncer hepático (Robens y Richard, 1992).

1.8.4. Detección de micotoxinas

La detección de las micotoxinas es un proceso de múltiples etapas pero generalmente consiste de tres pasos: toma de muestra, preparación de la muestra y análisis. Siempre existe un nivel de incertidumbre asociado, por lo que la verdadera concentración de la micotoxina no puede ser determinada con una certeza del 100 % (Whitaker, 2006).

El primer paso para el muestreo consiste en definir estadísticamente la población a partir de la cual se tomarán las muestras. El segundo paso, es cómo coleccionar las muestras. Analizar muestras a partir de granos altamente contaminados o libres de micotoxinas puede llevar a resultados erróneos. Por ello, es muy importante coleccionar numerosas submuestras al azar, para que cada unidad dentro del lote tenga la misma chance de ser elegida y el análisis del lote sea representativo (Miraglia *et al.*, 2005). Esto se debe a la distribución heterogénea de las micotoxinas en los productos y materias primas agrícolas destinados al consumo humano y animal. El número de partículas contaminadas puede ser muy bajo, sin embargo, el nivel de contaminación dentro de una partícula puede ser muy alto (Krska *et al.*, 2008). La necesidad de obtener una muestra representativa merece una particular consideración,

ya que un error en el planeamiento del muestreo puede afectar la confiabilidad en los niveles medidos de micotoxinas. El error total o variabilidad será la suma del error asociado a la toma de las submuestras en el lote mas el error en la preparación de la muestra y el error en la determinación analítica (Miraglia *et al.*, 2005).

Las diferentes propiedades químicas y físicas de las micotoxinas requieren métodos de análisis específicos de extracción, limpieza, separación y detección. Así, la mayoría de los métodos tienen como objetivo la detección de una micotoxina en particular, o en el mejor de los casos un grupo de micotoxinas estrechamente relacionadas. Los métodos analíticos basados en cromatografía o inmunoensayos usualmente requieren extracción con solventes para liberar la micotoxina de la matriz y un paso siguiente de limpieza (clean-up) para reducir el efecto matriz. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la micotoxina, pueden utilizarse varias combinaciones de solventes (Krska *et al.*, 2008). Una vez que la micotoxina ha sido extraída de la matriz, se realiza una limpieza del extracto para remover las impurezas antes de la determinación o cuantificación. Generalmente, en la limpieza del extracto se emplean columnas de extracción en fase sólida. Estas columnas usualmente están compuestas de sílica porosa, cuya superficie ha sido modificada para proveer adsorción selectiva, ya sea del analito o de la impureza. En este último caso, la ventaja es que sólo se necesita del solvente de extracción para purificar la muestra sin necesidad de un segundo solvente para la elución (CAST, 2003). Actualmente, también se utilizan columnas de inmunoafinidad comercialmente desarrolladas para la mayoría de las principales micotoxinas de interés en agricultura y salud. En este caso, el material de soporte presenta anticuerpos que se unen específicamente al analito, mientras que las impurezas de la muestra pasan a través de la columna. Luego el analito es removido con un solvente que desnaturaliza el anticuerpo. Una de las ventajas de estas columnas es la alta especificidad de la unión entre el analito y el anticuerpo (CAST, 2003). Además, se han desarrollado diferentes combinaciones de anticuerpos en una sola columna, la cual permite la determinación simultánea de más de una micotoxina por cada extracto de muestra (CAST, 2003; Shephard, 2008).

El paso final en el procedimiento analítico involucra la determinación de la presencia de la micotoxina por al menos un método de detección. Estos pueden clasificarse en métodos rápidos y de referencia (CAST, 2003).

Algunos métodos rápidos se describen a continuación (Zheng *et al.*, 2006):

- ✓ Método inmunológico de ELISA. Actualmente, la mayoría de los kits de ELISA disponibles para micotoxinas utilizan la cinética de unión anticuerpo-micotoxina,

reduciendo el tiempo de incubación a sólo unos minutos. A pesar de que al reducir el tiempo de incubación se pierde un poco de sensibilidad, estos kits suelen proporcionar resultados reproducibles y precisos.

- ✓ Flujo a través de membrana: se disponen los anticuerpos específicos anti-micotoxina sobre la superficie de una membrana porosa (usualmente de nitrocelulosa, difluoruro de polivinilideno o nylon). El extracto de la micotoxina a analizar se coloca sobre la membrana, y a continuación se agrega sobre la misma membrana un conjugado enzima-micotoxina. La micotoxina a detectar y el conjugado, compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Luego de un lavado se añade el sustrato de la enzima y se produce un cambio de color en las muestras negativas. La desventaja de este método es que la interpretación de los resultados puede ser difícil cuando la concentración de la micotoxina está cercana al límite de detección de la técnica.
- ✓ Test inmunocromatográfico o flujo lateral: la muestra se coloca sobre tiras reactivas con anticuerpos con partículas de oro. Si la micotoxina está presente, migra junto a los anticuerpos hasta la zona de detección. En esa zona existe un conjugado proteína-micotoxina que atrapa todas las partículas de anticuerpo que están libres de micotoxina y se produce cambio de color originando una línea visible. Este tipo de técnica es útil para la detección en el campo.

Los métodos de referencia tienen diversos propósitos: uno de ellos es confirmar la presencia de micotoxinas en muestras en las que se determinó dicha presencia a través de métodos rápidos o de “screening”. Otro objetivo es cuantificar la micotoxina presente en la muestra. Estos métodos son (CAST, 2003):

- ✓ Cromatografía líquida de alta presión (HPLC): es el método más usado para el análisis de las micotoxinas. Es altamente sensible y tiene bajos niveles de detección. Esta técnica separa componentes presentes en el extracto por la afinidad relativa de estos componentes a una columna estacionaria. Los compuestos eluidos de la columna pasan a través de un detector, que ayuda a cuantificar el componente de la muestra original (CAST, 2003). Los detectores utilizados son el ultravioleta (UV), fluorescencia y espectrometría de masa. El primero es universal, pero poco selectivo, ya que muchas moléculas absorben a la misma longitud de onda que las micotoxinas. El detector de fluorescencia, por el contrario, es muy selectivo, y el de espectrometría de masas genera detecciones específicas, basadas en la clasificación

de iones por un analizador de masas (Soriano del Castillo, 2007; Douglas *et al.*, 2008).

- ✓ Cromatografía gaseosa (CG): es una técnica basada en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria. Las micotoxinas son sustancias poco volátiles y se requiere de una derivatización previa para su análisis por CG. Algunas micotoxinas, entre ellas los tricotecenos, poseen grupos hidroxilos reactivos que pueden formar derivados trimetilsililo, susceptibles de ser determinados, por ejemplo, con un detector de captura de electrones. También pueden utilizarse columnas capilares o detectores de espectrometría de masas. Estos últimos se aplican cada vez más en sus modalidades tanto de impacto electrónico como de ionización química (Soriano del Castillo, 2007).
- ✓ Cromatografía en capa delgada (TLC): el rápido crecimiento de esta técnica durante los años '70 disminuyó con el surgimiento del HPLC. Sin embargo, con los avances de la técnica, se han reducido y mejorado sus limitaciones. El equipo básico para TLC consiste de un aplicador de muestra, placas de TLC, un contenedor de la fase móvil, y una lámpara UV para el análisis de la muestra. Los adsorbentes pueden ser de fase normal o reversa, siendo los de fase normal los más comúnmente usados para el análisis de las micotoxinas. Las lámparas UV se utilizan para la observación visual, estimación y cuantificación de las micotoxinas fluorescentes como las aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona y citrinina. En el caso del DON, nivalenol y fumonisinas, entre otros, la placa se cubre con un reactivo químico para formar un compuesto coloreado o fluorescente (Trucksses, 2008).

1.8.5. Regulación de micotoxinas en los alimentos

Las regulaciones para las micotoxinas han sido establecidas hacia fines de la década de 1960 con el propósito de proteger a los consumidores de los efectos tóxicos que las micotoxinas presentes en los alimentos pudiesen provocar. Las legislaciones internacionales, en lo que respecta a alimentos destinados al consumo humano y animal, son establecidas por el Codex Alimentarius, sin embargo, sus estándares no son obligatorios. En la Unión Europea, las bases legales para establecer los límites máximos permitidos para las micotoxinas están a cargo de la Comisión Reguladora (Council Regulation, EEC). Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay aplican regulaciones propuestas por el MERCOSUR (Mercado común del Sur) para aflatoxinas totales en maní, maíz y

subproductos, y para aflatoxina M₁ en leche. En los Estados Unidos, se establecen regulaciones a través de la FDA (CAST, 2003).

La necesidad de legislar sobre las concentraciones límites permitidas para las micotoxinas es reconocida por el mundo industrializado. En general, todos los países que han desarrollado economías de mercado disponen de regulaciones. Sin embargo, en los países en desarrollo, en donde la agricultura de subsistencia es aún significativa, no se han establecido dichas regulaciones. La decisión de los límites máximos permitidos en determinadas materias primas depende de diversos factores tales como (CAST, 2003):

- ✓ disponibilidad de datos toxicológicos.
- ✓ disponibilidad de datos acerca de la presencia de la micotoxina en diversas materias primas.
- ✓ homogeneidad de la concentración de micotoxina en un lote.
- ✓ disponibilidad de métodos analíticos.
- ✓ legislación de los países con los cuales existe contacto comercial.
- ✓ disponibilidad suficiente de alimentos para satisfacer la demanda de los mismos .

En el año 2006, el reglamento de la Comunidad Europea (CE) fijó el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. En el caso de las micotoxinas, allí pueden encontrarse los valores para aflatoxinas, patulina, DON, zearalenona y fumonisinas. Mediante el Reglamento de la CE del 2010 se modificaron los valores máximos en µg/kg del reglamento anterior, para el caso de aflatoxinas. Estos valores se resumen para algunos alimentos en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Contenidos máximos (µg/kg) de aflatoxinas en alimentos, según lo propuesto por la Comunidad Europea (CE N° 165/2010)

Aflatoxinas	B ₁	Suma B ₁ B ₂ G ₁ G ₂	M ₁
Maní para consumo directo o como ingrediente de otros alimentos	2,0	4,0	-
Cereales y subproductos	2,0	4,0	-
Maíz y arroz (consumo directo o como ingrediente; seleccionados o con tratamiento físico previo al consumo directo)	5,0	10	-
Leche cruda, tratada térmicamente y subproductos	-	-	0,05

Para el MERCOSUR (Res. N° 25/02) y el Código alimentario Argentino, los límites máximos admisibles de concentración de aflatoxinas son:

- ✓ 0,5 µg/l de aflatoxina M₁ en leche fluida
- ✓ 5,0 µg/kg de aflatoxina M₁ en leche en polvo
- ✓ 20 µg/kg de aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂ para maíz en grano, harinas o sémolas de maíz y maní entero o en pasta.

Existe una amplia variación de los estándares permitidos entre las agencias nacionales y multinacionales. Por ejemplo, de 48 países en los cuales existe un límite establecido para las aflatoxinas en alimento, los estándares varían entre 0 y 50 µg/kg (Dohlman, 2004). Se debe asegurar que las consideraciones políticas no pasen por alto los datos científicos, que surgen a partir de las evaluaciones de riesgo, a la hora de determinar una determinada posición nacional o regional sobre los límites permisibles para las micotoxinas. La implementación de procesos estándares de buenas prácticas de manejo y análisis de peligros en puntos críticos de control pueden ayudar significativamente a minimizar la contaminación por micotoxinas en alimentos destinados a consumo humano y animal (Kendra y Dyer, 2007).

En lo que respecta a las aflatoxinas y su regulación en alimentos de aves de corral, desde un punto de vista práctico y basándose en observaciones de campo, se pueden establecer las siguientes concentraciones máximas tolerables para aflatoxina B₁ en alimento compuesto destinado a las aves de corral (Gimeno y Martins, 2011):

- ✓ 10 µg/kg para aves jóvenes (pollos, pollitas, patos, pavos).
- ✓ 20 µg/kg para aves adultas (pollos, patos, pavos).
- ✓ 20 µg/kg para ponedoras y reproductoras.

Es muy difícil establecer las concentraciones máximas tolerables para micotoxinas. Hay varios factores que influyen la toxicidad (agravándola o disminuyéndola) durante el consumo del alimento contaminado por los animales, como por ejemplo la duración del consumo del alimento contaminado, la edad y el sexo de los animales, las infecciones bacterianas, virales o parasitarias que puedan tener los animales y fármacos suministrados durante el consumo del alimento en cuestión, las condiciones inadecuadas de “hábitat” (factores de estrés) de los animales o la presencia de sinergismos o asociaciones entre dos o más micotoxinas en el mismo alimento (Gimeno, 2009). En este sentido Rawal *et al.* (2010) señalan que, entre las diferentes especies de aves de corral, los pavos son los más susceptibles a las aflatoxinas, las codornices tienen susceptibilidad intermedia, mientras que

los pollos se consideran relativamente resistentes. A su vez, los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos y las hembras más resistentes que los machos (Wilber y Rodríguez, 2010). Andretta *et al.* (2011) realizaron un meta-análisis sobre la asociación de las micotoxinas con los parámetros reproductivos de pollos parrilleros. Los resultados de estos autores indican que el efecto de las micotoxinas sobre el peso de los animales fue más negativo en los pollos más jóvenes comparado con las aves adultas. Por otro lado, encontraron que por cada mg/kg de aumento de aflatoxina en la dieta, el peso relativo del hígado aumenta en un 0,23%.

Por otro lado, el transporte de los residuos de aflatoxina desde el alimento hacia los tejidos de los animales puede ser expresado como una relación de $n: 1$, donde n es la concentración de AFB₁ en el alimento necesaria para recuperar 1 unidad de concentración de aflatoxina residual y/o sus metabolitos en productos comestibles. En el caso de los huevos de las gallinas de postura los promedios de las relaciones de transmisión encontradas en la literatura son variables, dependiendo principalmente, del nivel de contaminación en el alimento y de la duración de la contaminación: 350:1 (Jacobson y Wiseman, 1974), 55.000-125.000:1 (Lötzsch y Leistner, 1976), 40.000:1 (Trucksses *et al.*, 1983), 66.200:1 (Wolzak *et al.*, 1985), y 5.000:1 (Oliveira *et al.*, 2000). Aunque estas relaciones sean variables según los distintos estudios, se debe considerar la importancia de los residuos de AFB₁ y/o sus metabolitos en huevo, ya que implican un riesgo potencial para la salud humana y, por lo tanto, debería ser incorporado en legislaciones futuras. Por ello, es importante el control de las raciones destinadas a las aves de postura, ya que podrían representar una fuente de exposición crónica a estas toxinas.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo

El conocimiento de la presencia de contaminación microbiológica por *Salmonella enterica* en granjas de gallinas ponedoras y en el huevo para consumo, junto con la presencia de aflatoxinas en el huevo, permitirán mejorar la comprensión de los factores de riesgo a los que las aves y la población humana están expuestas.

ObjetivosObjetivo general

Generar información referida a la presencia de *Salmonella* sp. y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales y el posible efecto de las prácticas de manejo sobre el aumento o disminución del grado de la contaminación microbiológica en estos animales.

Objetivos específicos

1. Estudiar la capacidad discriminadora de diferentes técnicas bacteriológicas y de PCR para la detección de *Salmonella enterica* en distintos tipos de matrices
2. Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en granjas de gallinas ponedoras comerciales.
3. Determinar la presencia de aflatoxinas en huevos producidos para consumo humano en granjas comerciales.
4. Identificar factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella enterica* y/o aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales.

Capítulo 2

Detección de *Salmonella* sp. en alimento, agua de bebida y excretas de aves de corral.

Una granja no es un ambiente único sino un complejo sistema de nichos biológicos en los que las bacterias sobreviven y se multiplican (Guard-Petter, 2001). 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 (Gast, 2008; Shivaprasad, 2003). Una vez que la granja está contaminada, es muy difícil eliminar las salmonelas 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).

La mayoría de los ingredientes de origen animal y vegetal usados como componentes del alimento para animales parecen estar propensos a la contaminación por *Salmonella* sp. Con frecuencia, los datos de prevalencia para *Salmonella* en ingredientes de alimentos para animales son difíciles de comparar entre distintos estudios, debido a las diferencias en los métodos de muestreo y cultivo que son aplicados. En la mayoría de los estudios, no hay información disponible referida a la probabilidad de identificar correctamente a una muestra como positiva a esta bacteria (EFSA, 2008). Ya que los ingredientes de los alimentos balanceados para animales usualmente son productos secos con baja actividad de agua, los métodos de aislamiento para *Salmonella*, 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 salmonelas no es uniforme, dificultando aún más la detección (Jones y Richardson, 2004). Por otro lado, los alimentos destinados a las gallinas ponedoras, pollos, patos o pavos, a menudo son tratados térmica o químicamente, para disminuir la contaminación por *Salmonella* (Matlho *et al.*, 1997). Ya que 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). Por su parte, Shivaprasad (2003) señaló que el alimento para consumo de las aves también puede constituir una fuente de contaminación tanto para *S. Pullorum* como para *S. Gallinarum*, aunque la contaminación por *S. Pullorum* parecería ser de menor importancia.

Por otra parte, el agua de bebida está involucrada en cada aspecto del metabolismo de las aves de corral. La misma juega un papel importante en la regulación de la temperatura, en la digestión del alimento y en la eliminación de los desechos del cuerpo. A temperaturas normales, las aves consumen el doble de agua que de alimento. Asimismo, el consumo puede cuadruplicarse si ocurre estrés por calor. Por lo tanto, es imprescindible prevenir la ocurrencia de enfermedades que puedan diseminarse a través del agua, las cuales resultarían en grandes pérdidas económicas. Aunque la presencia de *Salmonella* en el agua

está en función de la interacción de factores físicos y biológicos, este microorganismo puede sobrevivir semanas en dicho ambiente en condiciones favorables de temperatura, humedad y pH. Si bien existen diversos procedimientos para el aislamiento de las salmonelas en este tipo de muestra (Rice *et al.*, 2012), los métodos estandarizados disponibles sólo están destinados a detectar dicha bacteria en el alimento o en la materia fecal (Hsu *et al.*, 2011).

Durante el ciclo de vida de un lote infectado con un serotipo móvil de *Salmonella*, este microorganismo normalmente es excretado por un pequeño número de aves, a menudo de manera intermitente. Luego la colonización del tracto intestinal es el evento inicial del proceso de infección y puede resultar en la invasión de los tejidos reproductivos (Gast *et al.*, 2005, 2007b). En cambio, cuando un lote se infecta con *S. Gallinarum* la septicemia y la invasión de los tejidos del ave, incluyendo los del tracto reproductor, es un proceso que siempre ocurre; las aves que enferman de tifosis aviar pueden inclusive morir antes de que la bacteria colonice el intestino. Las aves que sobreviven a la tifosis permanecen en la granja como portadoras eliminando las salmonelas por materia fecal (Chacana y Terzolo, 2003; Shivaprasad, 2003). Ya se trate de tifosis o paratifosis, el lote puede haber adquirido la infección inicial a través de los reproductores de la cabaña de origen (transmisión vertical) y, una vez instalada la *Salmonella*, ésta puede difundirse en el lote mediante transmisión fecal-oral por contacto entre las aves o bien por medio de polvillo, agua, equipamiento e implementos de la granja e inclusive por vectores o portadores animados que incluyen insectos, pájaros, roedores, otros animales domésticos e inclusive personal de la granja (transmisión horizontal). La cáscara de los huevos puede contaminarse por medio de la excreta durante o después la oviposición. Por lo tanto, las excretas de las aves infectadas son una fuente muy importante en la transmisión vertical y horizontal (Shivaprasad, 2003; Gast *et al.*, 2005; Gast, 2008). Recientemente, García *et al.* (2011) compararon la contaminación por *Salmonella* en una granja de aves ponedoras con la presencia de este microorganismo en el huevo. Como método de aislamiento de *Salmonella* Enteritidis estos autores utilizaron el anexo D de la norma ISO 6579:2002. Como resultado informaron que la mayoría de las muestras positivas correspondieron a excretas (92%), seguidas por aislamientos obtenidos de cáscaras de huevos (34%) y con mucha menor frecuencia, hisopados cloacales (4%), mientras que el contenido de huevo fue en todos los casos examinados negativo a *Salmonella* sp.

Los métodos utilizados habitualmente para el aislamiento e identificación de *Salmonella* se basan en un paso de pre-enriquecimiento en medios no selectivos, seguido por un enriquecimiento en medios de cultivo selectivos, posterior plaqueo en agares selectivos-

diferenciales y por último, la identificación por medio de pruebas bioquímicas y serológicas. Ningún método tiene superioridad sobre otro y tanto la sensibilidad como la especificidad de los mismos depende tanto del tipo de muestra como de las condiciones del aislamiento (Rybolt *et al.*, 2004). Por otro lado, la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha resultado ser una herramienta de diagnóstico molecular altamente específica (Löfstrom *et al.*, 2004).

Se han realizado diversos estudios a fin de evaluar la capacidad de los métodos para la detección de *Salmonella* en distintas matrices (Rybolt *et al.*, 2004; Myint *et al.*, 2006; Eriksson y Aspan, 2007; Love y Rostagno, 2008; Singer *et al.*, 2009). La mayoría de estos estudios se han enfocado en el aislamiento de los serotipos móviles de *Salmonella* debido a que éstos son causa de zoonosis, sin embargo, en estas investigaciones no se tuvo en cuenta al serotipo *S. Gallinarum* con sus biovars *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

Considerando lo anteriormente expresado, los objetivos del presente capítulo son:

- ✓ Comparar técnicas de cultivo y PCR en términos de su capacidad para recuperar concentraciones bajas de *Salmonella* a partir de muestras de alimento, agua y excretas de aves de corral, contaminadas artificialmente con éste patógeno. Para el caso de alimento, se evaluará la recuperación de salmonelas dañadas térmicamente.

- ✓ Evaluar la capacidad discriminatoria de las técnicas utilizadas mediante el cálculo de la sensibilidad (Se), especificidad (Esp), precisión (Pre), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VVN) de cada técnica y la concordancia entre ellas.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1. Cepas de *Salmonella* empleadas en los ensayos de inoculación

Las cepas de *Salmonella* utilizadas en los ensayos de inoculación, se detallan en la Tabla 2.1. Las mismas provienen de las colecciones del Laboratorio de Bacteriología de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, del Laboratorio de Sanidad Aviar de la EEA INTA Concepción del Uruguay y de las colecciones de cultivo de Estados Unidos (ATCC, American Type Culture Collection).

Tabla 2.1. Cepas de *Salmonella* utilizadas en los ensayos de inoculación.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Origen y/o colección de cultivo
<i>Salmonella</i> Enteritidis PT1	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Colección de cultivo de los Estados Unidos
<i>Salmonella</i> Typhimurium 06/11	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	Colección de cultivo de los Estados Unidos
<i>Salmonella</i> Kentucky CUB 19/08	Expeller de soja, EEA INTA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> Livingstone CUB 52/10	Expeller de carne, EEA INTA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> Coeln CUB 21/08	Hisopado cloacal, EEA INTA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> Orion CUB 28/08	Hisopado cloacal, EEA INTA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> Infantis CUB 08/08	Órgano de ave, EEA INTA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> Gallinarum 93/110	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Gallinarum 88/322	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Gallinarum 80/111	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Gallinarum 81/86	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Gallinarum 03/121	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Gallinarum CUB 55/10	Órgano de ave, EEA INTA C. del Uruguay
<i>Salmonella</i> Pullorum ATCC 13036	Colección de cultivo de los Estados Unidos
<i>Salmonella</i> Pullorum 90/142	Órgano de ave, EEA INTA Balcarce

Para las muestras de alimento, se utilizaron 10 cepas de *Salmonella* (Tabla 2.1); cuatro de ellas serotipos móviles (*S.* Enteritidis PT1, *S.* Typhimurium 06/11, *S.* Kentucky CUB 19/08 y *S.* Livingstone CUB 52/10). Las seis cepas restantes correspondieron a cepas inmóviles (biovariedades *S.* Gallinarum 93/110, 88/322, 80/111, 81/86 y 03/121 y *S.* Pullorum 90/142). En los ensayos con excretas de gallina, los serotipos móviles inoculados fueron *S.* Enteritidis ATCC 13076, *S.* Typhimurium ATCC 13311, *S.* Coeln y *S.* Orion. Las cepas inmóviles correspondieron a *S.* Gallinarum CUB 55/10 y *S.* Pullorum ATCC 13036. Para las muestras de agua, se utilizaron los serotipos *S.* Enteritidis ATCC 13076, *S.* Typhimurium ATCC 13311, *S.* Kentucky CUB 19/08 y *S.* Infantis mientras que las cepas inmóviles inoculadas fueron *S.* Gallinarum 55/10 y *S.* Pullorum ATCC 13036.

Cada cepa fue obtenida de agar nutritivo (Acumedia, Lansing, Michigan) y cultivada a 37°C durante 24 h en caldo triptéina de soja (CTS; Merck, Darmstadt, Germany). La pureza de los cultivos se confirmó mediante siembra por estría en los medios MC y ATS. El número de microorganismos viables, expresado en UFC/ml, fue estimado mediante la técnica de Miles *et al.* (1938). El cultivo bacteriano fue centrifugado a 302 x g durante 15 min a temperatura ambiente (25±2°C). Posteriormente, el pellet fue resuspendido con una solución de Buffer fosfato salino (BFS: pH 7,4).

2.1.2. Muestras utilizadas en los ensayos de inoculación

- ✓ Alimento de aves de corral: las muestras de alimento para aves fueron provistas por granjas de gallinas ponedoras comerciales de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Antes de realizar los ensayos, cada muestra de alimento fue analizada por el método de enriquecimiento selectivo en caldo tetracionato (TT-alimento) (*vide infra*) para la búsqueda de *Salmonella* sp. antes de la contaminación artificial. Además, se realizaron recuentos de bacterias totales, Enterobacterias y hongos en ATS (Acumedia); agar MC (Acumedia) y agar Dicloran Rosa de Bengala cloranfenicol (DRBC, Oxoid, Basingtoke, Hampshire, England; cloranfenicol, Anedra, San Fernando, Argentina), respectivamente.

- ✓ Agua de bebida para aves: las muestras de agua fueron provistas por una granja de pollos parrilleros comerciales, ubicada en el departamento Uruguay, provincia de Entre Ríos, Argentina. Dicha granja obtiene su provisión de agua de pozo. La toma de las muestras de agua se realizó desde el grifo situado en el exterior de los galpones. Previamente, la parte exterior del grifo se expuso al fuego de un mechero; se dejó correr el agua entre tres y cinco minutos y posteriormente se tomó la muestra en una botella estéril. La misma fue etiquetada y llevada al Laboratorio de Sanidad Aviar del INTA Concepción del Uruguay e inmediatamente procesada para el ensayo. El agua de esta granja fue analizada previamente mediante los métodos bacteriológicos TT-agua y MSRV-agua (*vide infra*) para la búsqueda de *Salmonella*. Además se utilizó una prueba comercial (Aquamerck®, Darmstadt, Alemania) para detectar cloro total y libre.

- ✓ Muestras de excreta de aves: las muestras de excreta fueron provistas por granjas de gallinas ponedoras comerciales localizadas en la provincia de Entre Ríos, Argentina. Antes de realizar los ensayos, cada muestra se analizó por el método de tetracionato (TT-excreta, *vide infra*) con el propósito de confirmar la ausencia de *Salmonella* sp.

Además, se realizaron recuentos de bacterias totales y Enterobacterias en agar tripteína de soja (ATS, Acumedia, Lansing, Michigan) y agar MacConkey (MC, Acumedia, Lansing, Michigan), respectivamente.

2.1.3. Sección I. Detección de *Salmonella* en alimento.

2.1.3.1. Determinación de la temperatura y tiempo de exposición. Aplicación de un modelo matemático de ajuste.

2.1.3.1.1. Elección de la temperatura de exposición.

Para los ensayos se utilizó la cepa *S. Typhimurium* 06/11. La cepa fue obtenida de agar nutritivo según lo descrito en el punto 2.1.1. Se ensayaron tres temperaturas (50°C, 55°C, 60°C) durante 10 minutos. En un baño térmico, se colocaron tubos de ensayo con 4,5 ml de BFS (pH 7,4). Una vez que la temperatura alcanzó 50°C, 55°C ó 60°C, los tubos fueron inoculados con 0,5 ml de la suspensión de *S. Typhimurium* en BFS (Figura 2.1). Se tomaron, muestras del cultivo cada 2 minutos para realizar el recuento de la bacteria (UFC/ml) en 2 placas de cada uno de los siguientes medios de cultivo: ATS, MC (Acumedia) y agar verde brillante (VB, Oxoid, Basingtoke, Hampshire, England). Los valores de UFC/ml obtenidos en TSA fueron convertidos a logaritmo base 10 y se calculó la reducción decimal en base a la fórmula: $\log N/N_0$, siendo N el número de células en un determinado tiempo y N_0 el número inicial de células bacterianas. Estos datos fueron utilizados para la construcción de una curva de bacterias sobrevivientes en función del tiempo. Por otro lado, el daño celular se determinó mediante recuento de las diluciones decimales apropiadas en placas de ATS (no selectivo) MC (Acumedia) y agar verde brillante. El medio ATS fue utilizado para enumerar tanto células dañadas como sin dañar; los medios MC y VB fueron usados para enumerar solamente las bacterias sin daño celular. El daño celular se expresó como la proporción de bacterias dañadas sobre el total de la población (Liao y Fett, 2003):

$$\text{Daño celular} = \frac{\text{UFC/ml en ATS} - \text{UFC/ml en MC ó VB}}{\text{UFC/ml en ATS}} \times 100$$

Los ensayos se realizaron por duplicado. La elección de la temperatura para ser utilizada en las cepas de *Salmonella* antes de su inoculación en el alimento de las aves, se basó en aquella a la cual se produjera un daño celular entre el 50% y 100% para ambos

medios de cultivo y una reducción decimal del número de bacterias de hasta 4 unidades logarítmicas.

2.1.3.1.2. Determinación del tiempo de exposición.

Cada una de las cepas de *Salmonella* de tipo móvil (*S. Enteritidis* PT1, *S. Kentucky* y *S. Livingstone*) y las biovariedades *S. Gallinarum* 93/110 y *S. Pullorum* 90/142 fueron expuestas separadamente a la temperatura seleccionada en el punto 2.1.3.1.1 durante un período de tiempo, entre 0 y 10 minutos (Figura 2.1). Se tomaron, muestras del cultivo cada 2 minutos para realizar el recuento de la bacteria (UFC/ml) en ATS, VB y MC. El daño celular fue calculado según lo descrito en el punto 2.1.3.1.1. El tiempo de exposición para ser utilizado en las cepas de *Salmonella* antes de su inoculación en el alimento de las aves fue seleccionado en base a un % de daño celular entre el 50% al 100% para ambos medios de cultivo, MC y VB y una reducción decimal del número de bacterias de hasta 4 unidades logarítmicas. En base a este criterio, para la cepa *S. Typhimurium* se consideró el tiempo obtenido en el ensayo de elección de temperatura (punto 2.1.3.1.1). Para el caso de las restantes cepas de *S. Gallinarum*, se eligió el tiempo de exposición obtenido para la cepa 93/110. Por otro lado, las diferencias entre los valores promedios de daño celular (%) calculados en agar MC y VB fueron evaluadas mediante la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía.

2.1.3.1.3. Curvas de inactivación (supervivencia) celular

Con los datos de recuento bacteriano en TSA de las cepas expuestas a 60°C durante 10 minutos, se construyeron curvas de supervivencia en función del tiempo para 6 cepas de *Salmonella*. El ajuste de los datos experimentales a un modelo teórico fue realizado aplicando el modelo propuesto por Mafart *et al.* (2002), que se origina a partir de la distribución de frecuencias de Weibull para describir curvas de supervivencia no lineales de esporas bacterianas: $\log N / N_0 = - (t / \delta)^P$. N es el número de células sobrevivientes en un tiempo t, N_0 el número inicial de bacterias, δ representa el tiempo de la primera reducción decimal, y P es el parámetro de forma, que determina la concavidad hacia arriba ($P < 1$) o hacia abajo ($P > 1$) de la curva. Los parámetros δ y P se estimaron por regresión no lineal a través de la herramienta GInaFiT (Geeraerd *et al.*, 2005) de Microsoft Excel. El ajuste entre los datos teóricos y experimentales se evaluó a través de la suma de los errores al cuadrado (SEC) y el coeficiente de determinación (R^2). La SEC mide la desviación entre los valores experimentales y el modelo: un valor cercano a cero indica un mejor ajuste. Un valor de R^2

cercano a 1 indica que una gran proporción de la varianza de los datos es contemplada por el modelo.

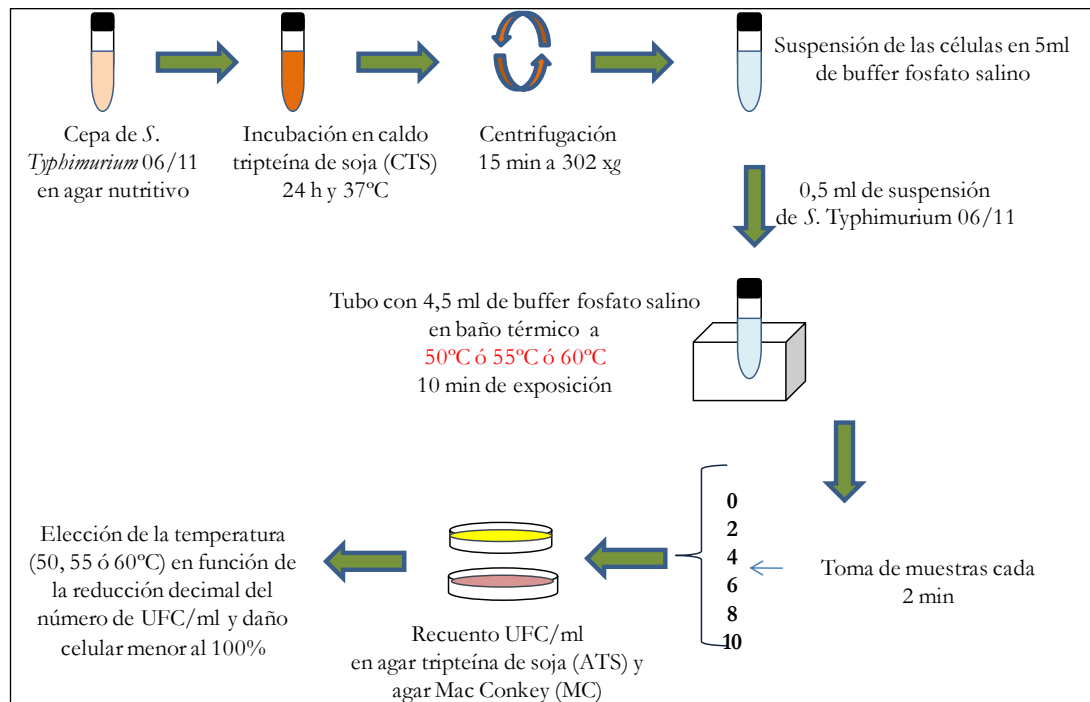


Figura 2.1 Flujograma del ensayo de selección de temperatura con la cepa de *S. Typhimurium* 06/11.

2.1.3.2. Ensayos de inoculación de salmonelas en alimento de aves

2.1.3.2.1. Preparación de los inóculos de *Salmonella* en muestras de alimento para aves

Se pesaron 25g de alimento para aves libre de *Salmonella* sp, en bolsas plásticas estériles. Luego del tratamiento térmico descrito en el punto 2.1.3.1.2 cuyo tiempo de exposición dependió de la cepa bacteriana se realizaron diluciones decimales seriadas de cada una en agua de peptona (0,1%). A partir de las diluciones apropiadas se inocularon las cepas móviles e inmóviles de *Salmonella* entre 8×10^0 a $8,3 \times 10^4$ UFC/25 g, y $7,4 \times 10^0$ a $2,3 \times 10^7$ UFC/25 g, respectivamente. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y replicados dos veces. Por lo tanto, se consideraron 4 muestras de cada dosis de *Salmonella* en cada ensayo. Además, se incluyeron controles de alimento sin inocular y cultivos de *Salmonella* en caldo CTS con sulfato de hierro II (CTS-Fe, 35 mg de sulfato de hierro II en 1000 ml de CTS).

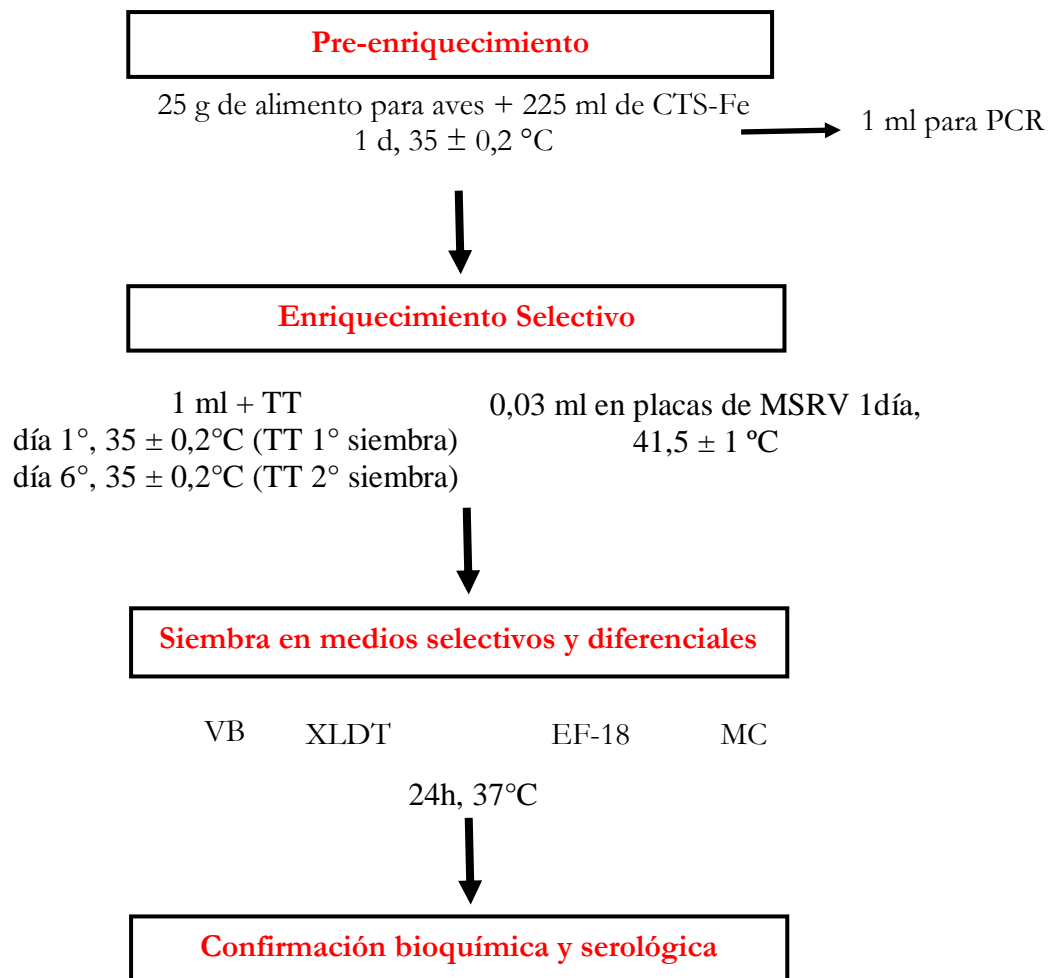


Figura 2.2. Flujograma para la detección de *Salmonella* en alimento balanceado para aves, mediante los métodos TT, MSRV y PCR. CTS-Fe= caldo tripteína de soja adicionado con sulfato de hierro II; TT1°= un día de incubación en caldo tetratonato; TT2°= 6 días de incubación en caldo tetratonato; VB= agar verde brillante; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato adicionado con tergitol 4; MC= agar MacConkey; EF-18 = agar EF-18.

2.1.3.2.2. Recuperación de las cepas de *Salmonella* a partir de las muestras de alimento inoculadas.

La Figura 2.2 muestra un diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* en alimento para aves mediante las técnicas TT-alimento y MSRV-alimento. Las muestras contaminadas con diferentes concentraciones de *Salmonella* sp. fueron pre-enriquecidas en 225 ml de CTS-Fe. 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 tetratonato (Acumedia) 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 (Sigma, Steinheim, Germany) y 40 mg/ml de

novobiocina (Sigma, Steinheim, Germany). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 6 días (Método TT-alimento). Al primer (TT 1°) y sexto día (TT 2°), el cultivo se sembró en estría por agotamiento en los ágaros xilosa lisina desoxicolato (XLD; Oxoid Ltd.) con tergitol 4 (XLDT; 4,6 ml/l; Sigma, St. Louis, MO), EF-18 (Acumedia), MC y VB. Todas las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Por otro lado, se inocularon 30 μl del cultivo CTS-Fe en medio MSR/V (Acumedia) y las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. (Método MSR/V-alimento). Posteriormente, se realizó la siembra en los mismos medios selectivos- diferenciales citados arriba.

2.1.3.2.3. Confirmación de las cepas inoculadas.

Las colonias, cuya morfología fue compatible con el género *Salmonella* de acuerdo con cada agar selectivo-diferencial, se inocularon en TSI (Acumedia) y LIA (Merck). Posteriormente, mediante la prueba de orto-nitrofenil- β -galactosidasa (ONPG) y la aglutinación en portaobjetos con antisueros polivalentes somático (O) (Difco; Becton, Dickinson y CO., Sparks, MD), se realizó la confirmación de los aislamientos.

2.1.3.2.4. Extracción de ADN

Las células bacterianas fueron recuperadas desde 1 ml del caldo de pre-enriquecimiento CTS-Fe, por microcentrifugación (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Alemania) a $4.000 \times g$ durante 15 min a 4°C y lavado dos veces con agua destilada estéril. El pellet fue resuspendido en 500 μl de agua destilada estéril. El ADN fue liberado de las células bacterianas por calentamiento durante 10 min a 100°C en baño seco (Labnet D1 100, Labnet International Inc., Edison, Estados Unidos) y luego centrifugado a $9.300 \times g$ durante 1 min a 4°C . El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y conservado a -70°C hasta su uso.

2.1.3.2.5. Ensayo de PCR

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania), amplificando una región del gen *invA* que permite la detección de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Dicha técnica de detección ha sido validada en ensayos interlaboratorios (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 primers 0,1 mM (Operon Biotechnologies GmbH, Alemania), 2,5 μl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 μl de MgCl_2 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/ μ l (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción.

Los primers usados para este propósito fueron P139 (5'→3: GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA) y P141 (5'→3: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN. Se incluyeron controles positivos (*Salmonella* sp.) y negativos, (*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.

Los productos de reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (BioRad, España) en buffer TBE (Tris-Acido bórico-EDTA), sembrándose 10 μ l del amplificado y un marcador de 100 pb (PB-L Products Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina). La tinción del gel se realizó con solución de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Los productos de amplificación (~284 pb) fueron visualizados con un transiluminador UV (Model M-20, UVP inc., Upland, California).

2.1.4. Sección II. Detección de *Salmonella* en agua de bebida de aves de corral.

2.1.4.1. Preparación de los inóculos de *Salmonella* en muestras de agua de bebida.

En una bolsa plástica estéril, se colocaron 25 ml de agua de bebida, comprobadamente libre de bacterias del género *Salmonella*. Una vez que las cepas a estudiar fueron cultivadas, tal como se describió en el punto 2.1.1, se realizaron diluciones seriadas de cada una en agua de peptona (0,1%). Se emplearon las diluciones seriadas en base \log_{10} desde $4,0 \times 10^0$ a $6,6 \times 10^3$ UFC/25 ml, y entre $1,2 \times 10^1$ a $8,4 \times 10^4$ UFC/25 ml de cepas móviles e inmóviles de *Salmonella*, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, por lo tanto se consideraron 3 muestras por cada dosis de *Salmonella* en cada ensayo. En total, fueron analizadas 90 muestras de agua previamente contaminadas con samonelas; en cada uno de los ensayos se incluyeron 3 muestras sin inocular, como controles negativos.

2.1.4.2. Recuperación de las cepas de *Salmonella* a partir de las muestras de agua inoculadas.

La Figura 2.3 muestra un diagrama de flujo para la detección de *Salmonella* en agua de bebida de aves mediante las técnicas TT-agua y MSRV-agua. Las muestras contaminadas con diferentes concentraciones de *Salmonella* sp. fueron preenriquecidas en 225 ml de agua

de peptona tamponada, doble concentración (APT-dc; Merck, Darmstadt, Germany). La mezcla se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h.

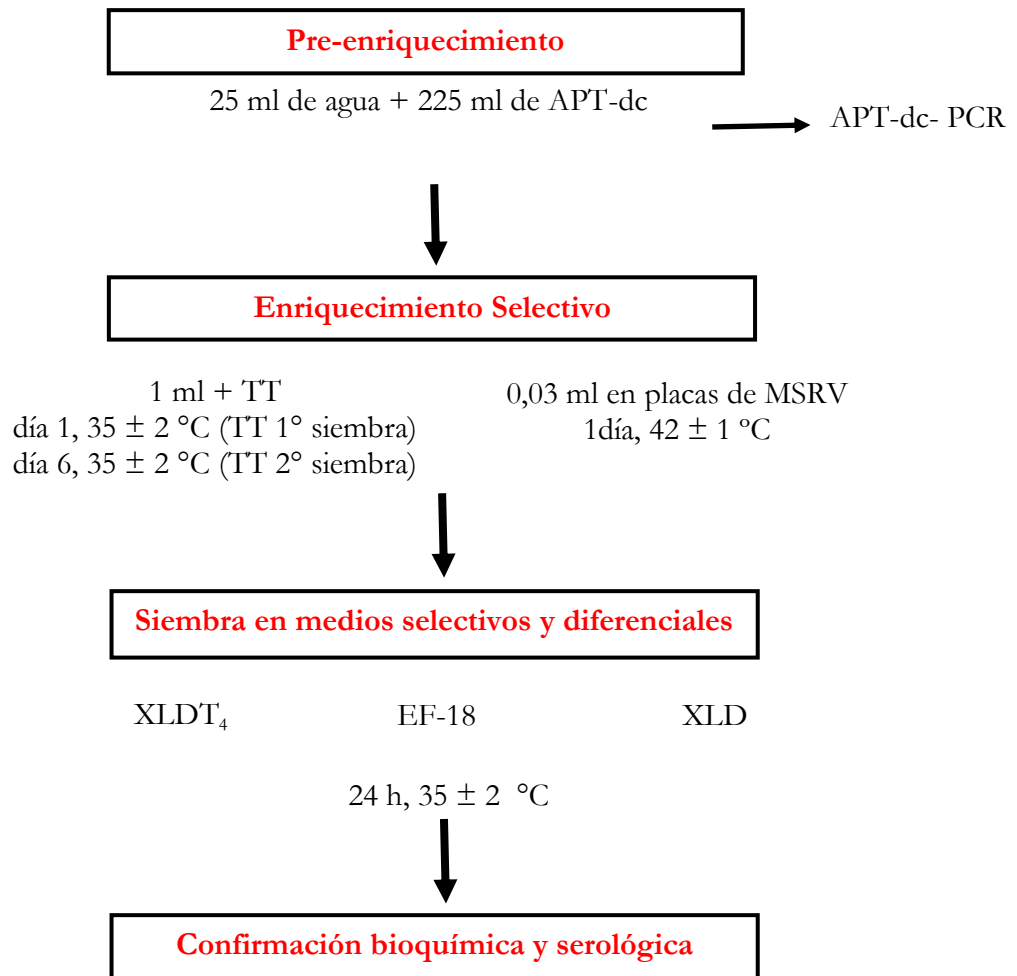


Figura 2.3. Flujograma para la detección de *Salmonella* en agua de bebida para aves de corral, mediante los métodos tetrionato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR-agua) con templados a partir de cultivo en agua de peptona tamponada (APT-PCR). APT-dc- Agua de peptona tamponada doble concentración; TT1º= un día de incubación en caldo TT; TT2º= 6 días de incubación en caldo TT; XLD= agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄= XLD adicionado con tergitol 4.

Luego, 1 ml del cultivo se transfirió a 10 ml de caldo TT (Acumedia) 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 al 0,1 % (Sigma) y novobiocina (40 mg/ml, Sigma). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 6 días (Método TT-agua). Al primer (TT 1º) y sexto día (TT 2º) una ansada de cultivo se sembró por estría por

agotamiento en agar XLD (Oxoid Ltd.), agar XLDT₄ y agar EF-18 (Acumedia). Las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Por otro lado, se inocularon 30 μl del cultivo APT-dc en medio MSRV (Acumedia) suplementado con 1 ml/l de solución de novobiocina al 2%; las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. Este último método se basó en el anexo D de la norma ISO 6579 (ISO, 2002). Posteriormente, se realizó la siembra en estría por agotamiento en los mismos medios agarizados selectivos-diferenciales que se utilizó para técnica de TT-agua (Método MSRV-agua). Con las colonias compatibles a *Salmonella* de acuerdo a cada agar selectivo, se realizó lo descrito en el punto 2.1.3.2.3.

2.1.4.3. Extracción de ADN y ensayo de PCR

Las células bacterianas fueron recuperadas desde 1 ml del caldo pre-enriquecimiento APT-dc. Luego, la extracción del ADN bacteriano se realizó según lo descrito en el punto 2.1.3.2.4.

La reacción de PCR se realizó para el gen *invA* según lo descrito en el punto 2.1.3.2.5. Además se incluyó 2 μl de un control de amplificación interno (CAI) de acuerdo a Malorny *et al.* (2003) y fue co-amplificado con cada muestra para indicar posibles inhibidores derivados de la muestra de ADN.

2.1.5. Sección III. Detección de *Salmonella* en excreta de aves.

2.1.5.1. Preparación de los inóculos de *Salmonella* en muestras de excreta de aves

En una bolsa plástica estéril se pesaron 25g de excreta de aves, comprobadamente libre de bacterias del género *Salmonella* sp. Una vez que las cepas a estudiar fueron cultivadas, tal como se describió en el punto 2.1.1, se realizaron diluciones seriadas de cada una en agua de peptona (0,1%). Se emplearon las diluciones seriadas en base \log_{10} desde $2,2 \times 10^0$ hasta $1,8 \times 10^8$ UFC/25g, y desde $6,9 \times 10^0$ hasta $8,4 \times 10^7$ UFC/25g, respectivamente para las cepas móviles de *Salmonella* y las biovariedades *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036, respectivamente. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, por lo tanto, se analizaron 3 muestras de cada una de las dosis de *Salmonella* empleadas en cada ensayo. En total fueron analizadas 138 muestras de excreta; en cada uno de los ensayos se incluyeron 3 muestras sin inocular como controles negativos.

2.1.5.2. Recuperación de las cepas de *Salmonella* a partir de las muestras de excreta inoculadas.

La Figura 2.4 muestra un diagrama de flujo de los cultivos que se efectuaron para la detección de *Salmonella* sp. en excretas de ave mediante las técnicas TT-excreta y MSRVS-excreta. Las muestras que habían sido previamente contaminadas con diferentes concentraciones de *Salmonella* sp. fueron pre-enriquecidas en 225 ml de agua de peptona tamponada (APT; Merck, Darmstadt, Germany). La mezcla se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Luego, 1 ml del cultivo se transfirió a 10 ml de caldo TT (Acumedia) 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 al 0,1 % (Sigma, Steinheim, Germany) y novobiocina (40 mg/l, Sigma, Steinheim, Germany). El cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 6 días (Método TT-excreta). Al primer (TT 1°) y sexto día (TT 2°) una gota del TT incubado fue sembrada mediante estría por agotamiento en placas de Petri conteniendo agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD; Oxoid Ltd.), agar XLD adicionado con tergitol 4 (XLDT; 4,6 ml/l; Sigma, St. Louis, MO) y EF-18 (Acumedia). Las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Por otro lado, se inocularon 30 μl del cultivo APT en medio MSRVS (Acumedia) 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 24 h. Este último método se basó en la técnica descrita en el anexo D de la norma ISO 6579 (ISO, 2002). Posteriormente, se realizó la siembra en estría por agotamiento en los mismos medios agarizados selectivos-diferenciales que se utilizó para técnica de TT (Método MSRVS-excreta). Con las colonias compatibles a *Salmonella* de acuerdo a cada agar selectivo, se realizó lo descrito en el punto 2.1.3.2.3.

2.1.5.3. Extracción de ADN y ensayo de PCR

Las células bacterianas fueron recuperadas desde 1 ml del caldo del pre-enriquecimiento APT y desde 1 ml del caldo de enriquecimiento TT. Además, se tomó con un ansa una porción de cultivo desde MSRVS y fue resuspendida en 1 ml de agua destilada estéril. Para cada una de estas muestras, la extracción se basó en el protocolo de Perez *et al.* (2008). Las muestras fueron centrifugadas (Centrifuga Eppendorf 5415 R, Alemania) a $10,400 \times g$ durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 1 ml de buffer de lisis, conteniendo 0,2 % de Triton 100 X (Sigma) en Tris-HCL (Bio-rad, Hercules, CA) y centrifugadas a $13,400 \times g$ durante 6 minutos a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Este paso se repitió dos veces. Luego el pellet fue resuspendido en 1 ml de agua destilada estéril y centrifugado a $13,400 \times g$ durante 1 minuto. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 500 μl de agua

desmineralizada estéril y cada muestra se incubó 10 min a 100°C en baño seco (Labnet D1 100, Labnet International Inc., Edison, Estados Unidos). Luego, cada muestra fue centrifugada a 9.300 g durante 1 min. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y conservado a -70 °C hasta su uso. La reacción de PCR para el gen *invA* se realizó de la misma manera que lo descrito en el punto 2.1.3.2.5.

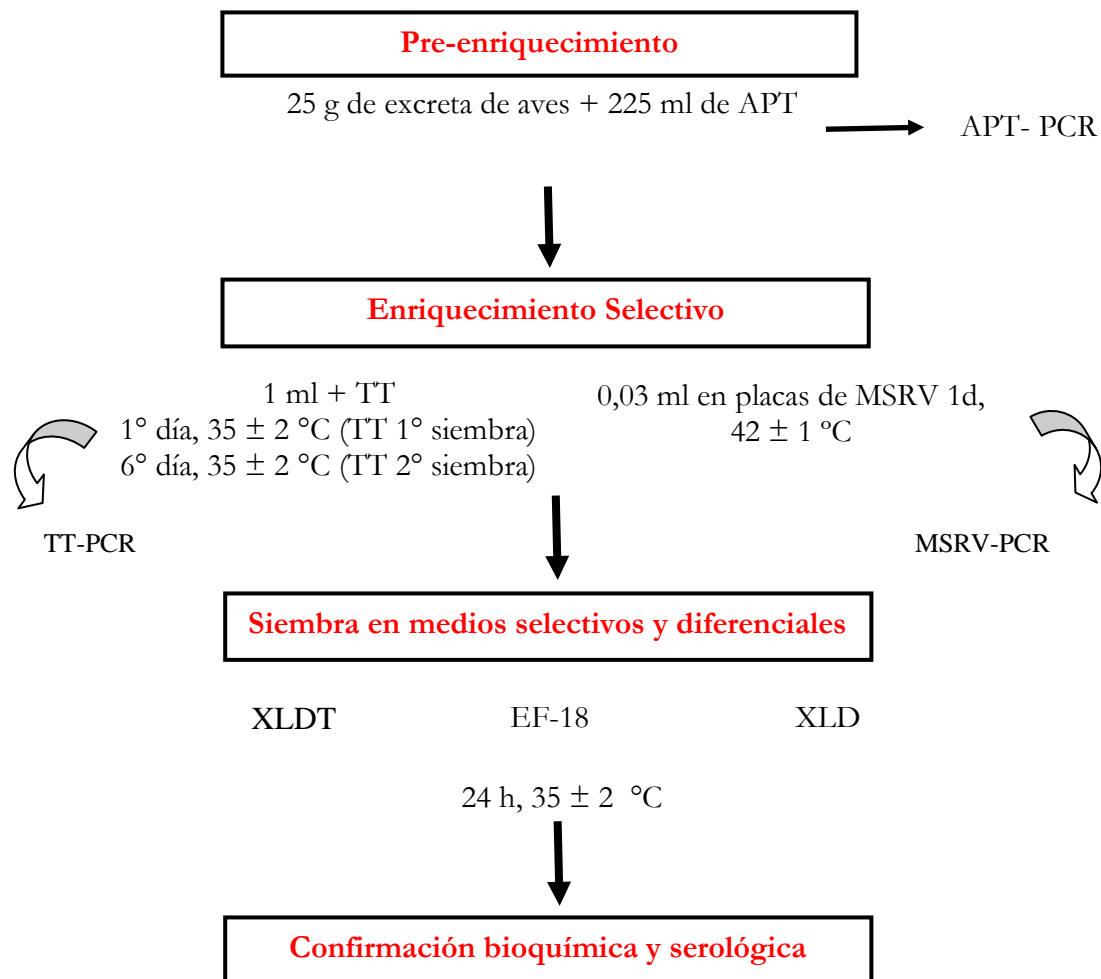


Figura 2.4. Flujograma para la detección de *Salmonella* en excreta de aves, mediante los métodos tetratrionato (TT), Rappaport –Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) y agua de peptona tamponada (APT)- PCR. TT1º= un día de incubación en caldo TT; TT2º= 6 días de incubación en caldo TT; XLD= agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄=agar XLD adicionado con tergitol 4. EF-18 = agar EF-18.

2.1.6. Criterios de capacidad discriminatoria y límite de detección de las técnicas

El límite de detección de los métodos se definió como la menor dilución en la cual cada cepa de *Salmonella* pudo ser recuperada. Los parámetros de Pre, Se, Esp, VPP y VPN

fueron calculados para cada método. Todas las muestras sin inocular se consideraron negativas para *Salmonella* sp. (verdaderos negativos), mientras que todas las muestras inoculadas se consideraron verdaderos positivos. Una muestra positiva en al menos uno de los medios selectivos-diferenciales utilizados en las tres matrices analizadas (alimento, agua y excreta) se consideró positiva para los métodos bacteriológicos empleados. Basado en estas premisas, los datos de capacidad discriminatoria fueron obtenidos usando las siguientes definiciones y fórmulas:

- ✓ Verdaderos positivos (VP): la muestra fue definida como VP cuando *Salmonella* fue detectada en muestras donde había sido inoculada experimentalmente.
- ✓ Verdaderos negativos (VN): la muestra fue definida como VN cuando *Salmonella* no fue detectada en muestras donde no había sido inoculada experimentalmente.
- ✓ Falso positivo (FP): una muestra fue definida como FP cuando *Salmonella* fue detectada en una muestra donde no había sido inoculada experimentalmente.
- ✓ Falso negativo (FN): una muestra se definió como FN cuando *Salmonella* no fue detectada en una muestra donde había sido inoculada experimentalmente.
- ✓ Precisión (Pre): es una medida de la capacidad de un método para clasificar correctamente muestras conteniendo *Salmonella* como positiva, y muestras que no contienen *Salmonella* como negativa para este microorganismo.

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

- ✓ Sensibilidad (Se): es una medida de la capacidad de un método para clasificar una muestra conteniendo *Salmonella* como positiva para este microorganismo.

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

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

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

- ✓ Valor predictivo positivo (VPP): es una medida de la probabilidad que una muestra positiva a la prueba para *Salmonella* sea correctamente determinada.

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

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

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

2.1.7. Análisis estadístico

Para comparar los resultados de los ensayos de inoculación de alimento, agua y excretas, se usó la prueba de hipótesis para diferencia de proporciones, asumiendo que todos los valores son igualmente probables. Cada valor de Pre, Se, 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 programa OCTAVE, desarrollado por el Grupo de Métodos Numéricos de la Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina (Proyecto 25D041). Los valores informados definieron el límite de un intervalo que, con un 95 % de seguridad, contiene los verdaderos valores de Pre, Se, Esp, VPP y VPN. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de $P < 0,05$.

La concordancia entre los métodos bacteriológicos y la PCR para la detección de *Salmonella* en los tres tipos de muestra estudiados fue evaluada mediante el estadístico Kappa (Martin, 1977). El mismo fue calculado para evaluar el grado de concordancia de los métodos para clasificar las muestras como positivas o negativas más allá del azar (Dawson y Trapp, 2005). 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).

2.2 Resultados

2.2.1. Sección I. Detección de *Salmonella* en alimento.

2.2.1.1. Determinación de temperatura y tiempo de exposición y modelo matemático de ajuste.

2.2.1.1.1. Elección de la temperatura de exposición

A 50°C y 55°C se observó reducción decimal en el número de bacterias, durante los 10 min, menor a una unidad logarítmica (Figura 2.5). Sin embargo, el daño celular fue menor al 30% (Tabla 2.2). A los 60°C de exposición, se alcanzaron altos porcentajes de daño celular entre los 2 y 6 minutos de tratamiento, con una reducción decimal menor a

una unidad logarítmica en los 2 minutos de exposición. Por ello, la temperatura de 60°C fue seleccionada para el tratamiento posterior. Sólo para esa temperatura durante 8 minutos de exposición se observó diferencia significativa entre los valores obtenidos de daño celular entre MC y VB.

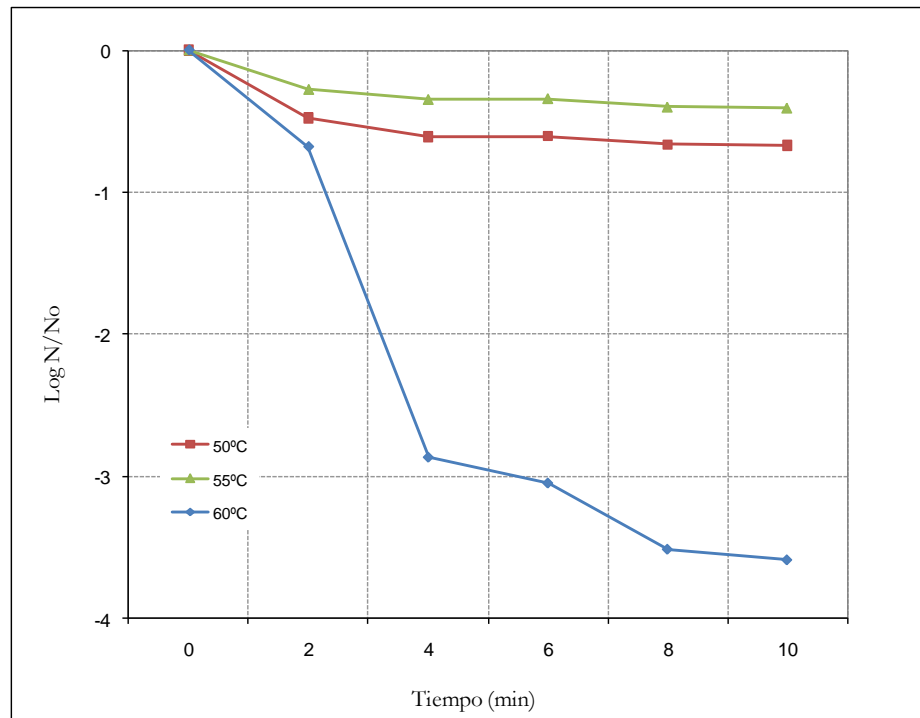


Figura 2.5. Inactivación de *S. Typhimurium* 06/11 para las tres temperaturas ensayadas (50, 55 y 60°C). N = número de células en un determinado tiempo. N_0 = número inicial de células bacterianas.

2.2.1.1.2. Elección del tiempo de exposición para cada cepa bacteriana.

Para la cepa *S. Typhimurium* 06/11, el tiempo de exposición elegido fue de 2 min, de acuerdo a los resultados obtenidos en el punto 2.1.3.1.1. La tabla 2.3 muestra el resultado de la exposición durante 10 minutos a 60°C de 5 cepas de *Salmonella*. En general, el daño celular (%) dependió de la cepa empleada y, en algunos casos, del tiempo de exposición a 60°C y del medio de cultivo selectivo-diferencial utilizado. Por su parte, la reducción decimal dependió de la cepa bacteriana y del tiempo de exposición (Figura 2.6).

Tabla 2.2. Porcentajes de daño celular para las tres temperaturas ensayadas a los diferentes tiempos de tratamiento para la cepa *S. Typhimurium* 06/11, según los conteos de bacterias en agar Mac Conkey (MC) y agar Verde Brillante (VB). Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.

Temperatura(°C)	Tiempo (min)	Daño celular (%)	
		MC	VB
50	2	12,6 \pm 9,5 ^{a1}	23,6 \pm 6,1 ^{a1}
	4	12,3 \pm 10,3 ^{a1}	1,5 \pm 9,2 ^{a1}
	6	4,2 \pm 4,6 ^{a,1}	18,6 \pm 10,9 ^{a,1}
	8	1,3 \pm 14,2 ^{a,1}	8,7 \pm 2,9 ^{a,1}
	10	13,5 \pm 7,8 ^{a,1}	23,5 \pm 24,6 ^{a,1}
55	2	7,1 \pm 8,3 ^{a,1}	7,7 \pm 5,6 ^{a,1}
	4	15,5 \pm 3,2 ^{a,1}	14,6 \pm 6,1 ^{a,1}
	6	22,4 \pm 9,6 ^{a,1}	20,0 \pm 5,6 ^{a,1}
	8	29,8 \pm 22,2 ^{a,1}	24,7 \pm 6,2 ^{a,1}
	10	23,1 \pm 18,2 ^{a,1}	24,4 \pm 11,8 ^{a,1}
60	2	99,2 \pm 0,4 ^{a,1}	98,0 \pm 1,1 ^{a,1}
	4	85,93 \pm 15,1 ^{a,1}	81,2 \pm 16,4 ^{a,1}
	6	86,4 \pm 10,4 ^{a,1}	80,5 \pm 19,3 ^{a,1}
	8	69,8 \pm 15,6 ^{a,1}	39,4 \pm 6,2 ^{b,2}
	10	49,4 \pm 20,7 ^{b,1}	38,6 \pm 7,9 ^{b1}

^{a,b}Valores con letras diferentes en la misma columna para cada temperatura son significativamente distintos (P<0,05)

^{1,2}Valores con números diferentes en la misma fila son significativamente distintos (P<0,05)

Los valores después del signo \pm indican la desviación estándar de las mediciones.

Tabla 2.3. Porcentajes de daño celular en agar Mac Conkey (MC) y agar verde brillante (VB) para las cepas de *Salmonella* sp. expuestas a 60°C. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.

Cepas	Tiempo	Daño celular (%)	
		MC	VB
<i>S. Enteritidis</i> PT1	2	80,6 \pm 25,5 ^{b,1}	83,1 \pm 12,9 ^{a,1}
	4	54,5 \pm 11,2 ^{a,1}	42,9 \pm 8,1 ^{b,1}
	6	60,9 \pm 7,7 ^{a,b,1}	36,8 \pm 10,5 ^{b,2}
	8	83,7 \pm 8,7 ^{b,1}	45,9 \pm 12,0 ^{b,2}
	10	46,8 \pm 9,4 ^{a,1}	45,4 \pm 3,4 ^{b,1}
<i>S. Livingstone</i>	2	80,3 \pm 12,7 ^{a,1}	62,7 \pm 10,9 ^{a,2}
	4	91,7 \pm 10,8 ^{a,1}	87,3 \pm 7,3 ^{a,1}
	6	86,6 \pm 5,58 ^{a,1}	77,6 \pm 20,6 ^{a,1}
	8	90,7 \pm 4,03 ^{a,1}	80,9 \pm 27,9 ^{a,1}
	10	72,9 \pm 23,4 ^{a,1}	68,7 \pm 23,1 ^{a,1}
<i>S. Kentucky</i>	2	41,5 \pm 23,7 ^{a,1}	36,9 \pm 19,5 ^{a,1}
	4	46,08 \pm 28,3 ^{a,1}	47,8 \pm 30,2 ^{a,1}
	6	78,2 \pm 16,2 ^{a,1}	57,7 \pm 18,0 ^{a,1}
	8	78,0 \pm 6,3 ^{a,1}	70,6 \pm 22,3 ^{a,1}
	10	72,4 \pm 24,1 ^{a,1}	55,6 \pm 14,2 ^{a,1}
<i>S. Gallinarum</i> 93/110	2	88,0 \pm 5,6 ^{a,1}	61,5 \pm 18,3 ^{a,2}
	4	70,2 \pm 19,5 ^{b,1}	61,1 \pm 14,0 ^{a,1}
	6	87,99 \pm 7,25 ^{a,1}	34,15 \pm 19,5 ^{a,2}
	8	90,21 \pm 7,08 ^{a,1}	40,8 \pm 10,6 ^{a,2}
	10	ND	ND
<i>S. Pullorum</i> 90/142	2	75,3 \pm 12,8 ^{a,1}	53,2 \pm 16,2 ^{a,1}
	4	70,6 \pm 11,4 ^{a,1}	39,3 \pm 13,2 ^{a,2}
	6	43,1 \pm 14,0 ^{b,1}	45,9 \pm 9,0 ^{a,1}
	8	57,6 \pm 23,6 ^{a,1}	53,0 \pm 12,8 ^{a,1}
	10	57,0 \pm 2,5 ^{a,1}	36,5 \pm 21,9 ^{a,1}

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

^{1,2} Valores con números diferentes en la misma fila son significativamente distintos ($P < 0,05$).

ND= no detectado ($< 4 \times 10^2$ UFC/ml)

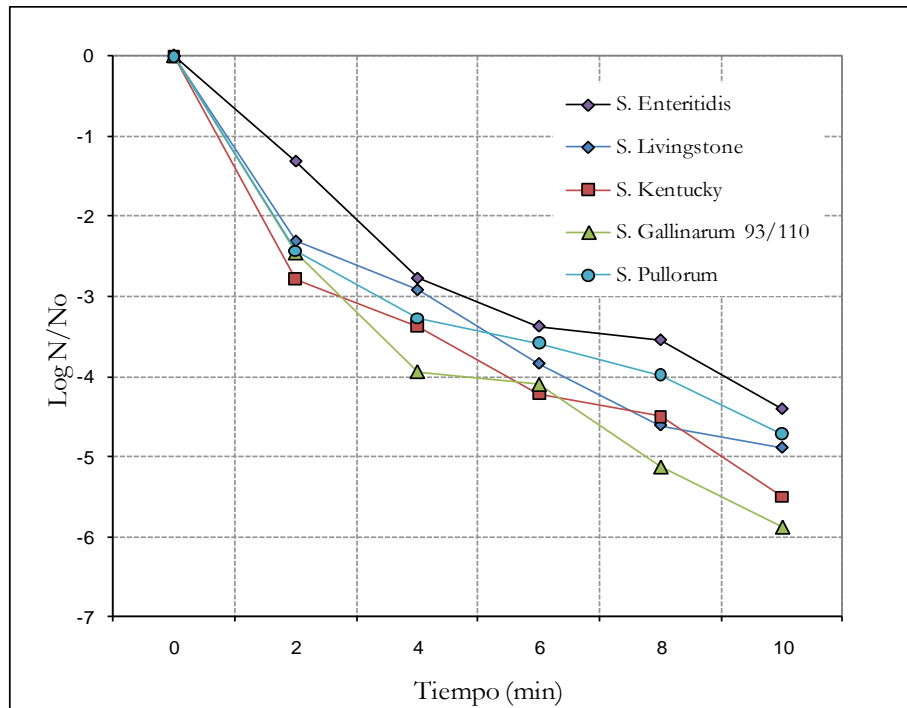


Figura 2.6. Inactivación de las cinco cepas de *Salmonella* sp. expuestas a 60°C durante 10 minutos.

La cepa de *S. Enteritidis* mostró un daño celular en MC mayor a 60% entre los tiempos 2, 6 y 8 min, sin diferencia estadística entre ellos. Sólo en VB el % de daño celular fue mayor al 50% a los 2 minutos de exposición. Además, la reducción decimal estuvo entre 1,3 y 4,4 unidades logarítmicas. Por todo ello, se eligió el tiempo de tratamiento de 2 minutos para esa cepa. Por otro lado, la cepa de *S. Livingstone* presentó daño celular entre 68% a 91%, sin diferencia estadística entre los tiempos de exposición y sólo diferente en el conteo bacteriano a los 2 minutos en los medios de cultivo selectivos utilizados. La reducción decimal estuvo entre 2,8 y 4,9 unidades logarítmicas. Se eligió el tiempo de exposición de 4 minutos para esa cepa. La cepa de *S. Kentucky* tuvo un daño celular entre 37% y 78%, sin diferencia estadística entre los tiempos de exposición y medios selectivos usados. La reducción decimal estuvo entre 2,7 y 5 unidades logarítmicas. Se eligió el tiempo de 6 minutos para esa cepa. Por su parte, la cepa de *S. Pullorum* tuvo un daño celular entre 39% y 75%, sin diferencia estadística entre los tiempos de exposición para el VB. Para el MC, sólo se observó diferencia estadística a los 6 minutos de exposición. La reducción decimal estuvo entre 2,4 y 4,7 unidades logarítmicas. Se eligió el tiempo de 2 minutos para esa cepa.

Los valores de daño celular no pudieron calcularse a los 10 min en la cepa *S. Gallinarum* 93/110, debido a que no hubo crecimiento bacteriano en ninguno de los medios utilizados (límite de detección: 4×10^2 UFC/ml). Por otro lado, sólo a los 4 minutos de exposición se observó diferencia estadística en el daño celular en MC. En VB no hubo diferencia en ese parámetro entre los 2 y 8 minutos de exposición. La reducción decimal estuvo entre 2, 4 y 6 unidades logarítmicas. Se eligió el tiempo de 2 minutos para esa cepa y las restantes *S. Gallinarum* utilizadas.

2.2.1.1.3. Curvas de inactivación celular

En relación al ajuste de las curvas de inactivación al modelo propuesto por Mafart *et al.* (2002), los datos experimentales ($\log N/N_0$ en función del tiempo) se correspondieron a los datos teóricos calculados en el modelo, con valores de R^2 mayores a 0,90 y de SCE menores a 0,34 (Tabla 2.4). Por lo anterior, el modelo fue útil para describir la cinética de inactivación celular. Los tiempos para la primera reducción decimal estuvieron entre 0,31 y 0,91. Los parámetros de forma en las distintas cepas variaron entre 0,43 y 0,61, por lo que las curvas resultaron cóncavas hacia arriba. La Figura 2.7 ilustra las curvas de inactivación y el ajuste del modelo para las cepas de *Salmonella* sp. ensayadas.

Tabla 2.4. Valores de tiempo para la primera reducción decimal (δ), parámetro de forma (P), suma de cuadrado de errores (SCE), y R^2 para el ajuste de las curvas de inactivación. Para el caso de δ , los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.

Cepa	δ	P	SCE	R^2
<i>S. Livingstone</i> CUB 52/10	0,51 \pm 0,17	0,54	0,03	0,99
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	0,31 \pm 0,30	0,43	0,14	0,97
<i>S. Typhimurium</i> 06/11	0,91 \pm 0,94	0,59	0,33	0,91
<i>S. Enteritidis</i> PT1	0,89 \pm 0,45	0,61	0,09	0,97
<i>S. Gallinarum</i> 93/110	0,35 \pm 0,19	0,53	0,09	0,98
<i>S. Pullorum</i> 90/142	0,36 \pm 0,19	0,45	0,04	0,99

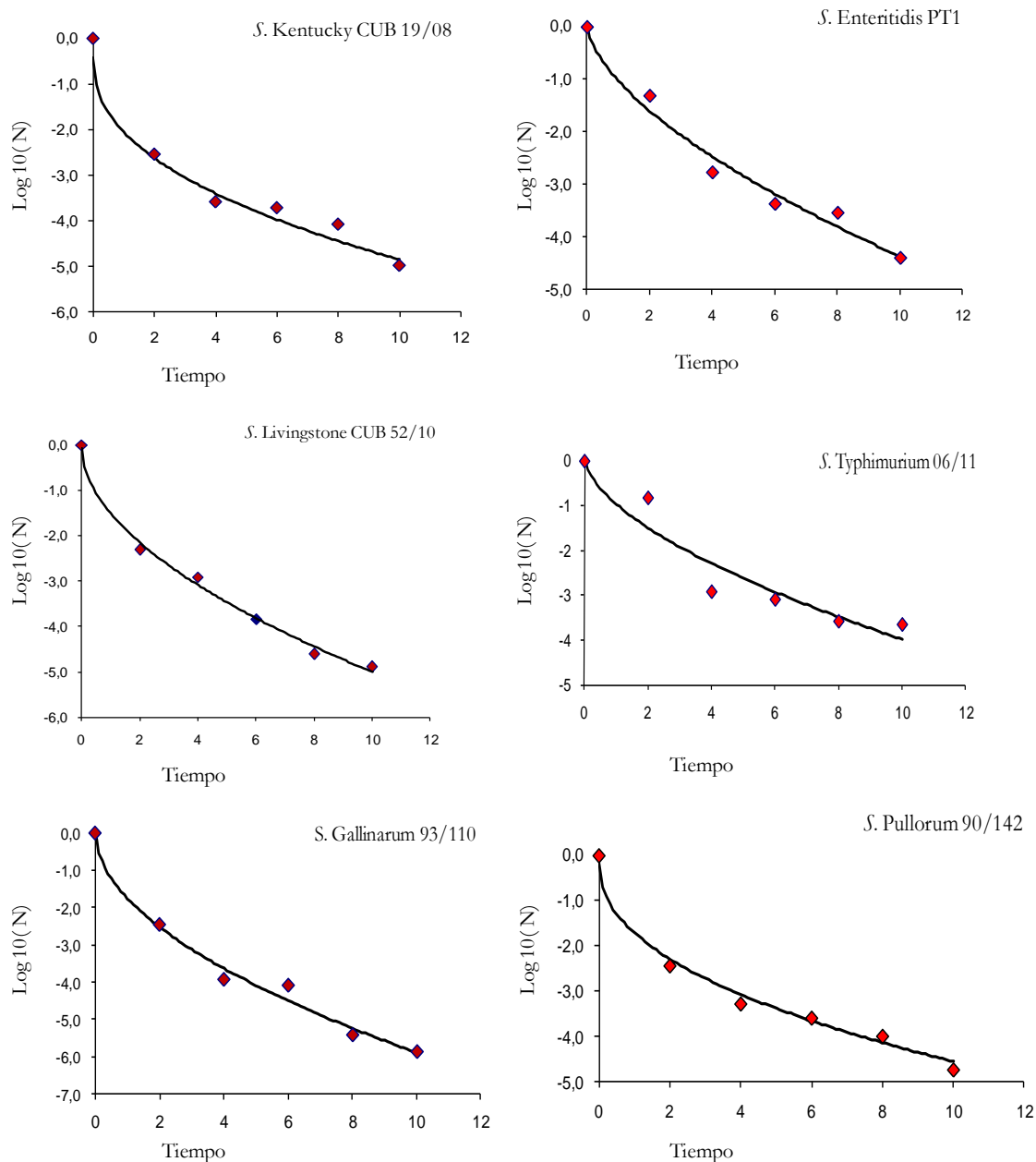


Figura 2.7. Ajuste de las curvas de inactivación de 6 cepas de *Salmonella* al modelo $\log N/N_0 = -(t/\delta)^P$; donde N es el número de células sobrevivientes en un tiempo t , N_0 el número inicial de bacterias, δ representa el tiempo de la primera reducción decimal, y P es el parámetro de forma. (♦) valores experimentales; (—) valores teóricos.

2.2.1.2. Ensayos de inoculación de salmonelas en alimento de aves

2.2.1.2.1. Daño bacteriano en agar MacConckey y Verde Brillante

El daño celular (%) dependió del medio selectivo utilizado y la cepa empleada (Tabla 2.5); fue más alto en MC que en VB en 5 de los 10 serotipos ensayados. Este parámetro estuvo entre 52% y 88% para MC y 10% y 85% para VB.

Tabla 2.5. Daño celular (%) para cada cepa de *Salmonella* sp. en agar Mac Conckey (MC) y Verde Brillante (VB) antes de su inoculación en alimento balanceado de aves. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar.

Serotipo de <i>Salmonella</i>	Tiempo de exposición (min) a 60°C	Daño bacteriano (%)	
		MC	VB
<i>S. Enteritidis</i> PT1	2	87,4 \pm 1,3 ^a	78,8 \pm 6,3 ^b
<i>S. Typhimurium</i> 06/11	2	88,3 \pm 3,9 ^a	85,2 \pm 4,8 ^a
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	6	68,0 \pm 0,9 ^a	63,6 \pm 10,3 ^a
<i>S. Livingstone</i> CUB 52/10	4	81,9 \pm 8,2 ^a	44,3 \pm 24,8 ^b
<i>S. Pullorum</i> 90/142	2	64,3 \pm 0,6 ^a	41,3 \pm 5,2 ^b
<i>S. Gallinarum</i> 93/110	2	85,2 \pm 14,6 ^a	75,0 \pm 24,1 ^a
<i>S. Gallinarum</i> 88/322	2	68,7 \pm 11,6 ^a	27,1 \pm 12,2 ^b
<i>S. Gallinarum</i> 80/111	2	87,3 \pm 7,0 ^a	83,1 \pm 17,1 ^a
<i>S. Gallinarum</i> 81/86	2	51,8 \pm 27,5 ^a	10,1 \pm 6,17 ^b
<i>S. Gallinarum</i> 03/121	2	64,1 \pm 12,4 ^a	55,5 \pm 14,8 ^a

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

2.2.1.2.2. Recuento de microorganismos en alimento de aves

Los resultados de los recuentos de microorganismos en las muestras de alimento fueron los siguientes: $2,0 \times 10^5$ UFC/g de bacterias totales; $6,4 \times 10^3$ UFC/g de Enterobacterias y $4,5 \times 10^4$ UFC/g para la flora fúngica.

2.2.1.2.3. Capacidad discriminatoria de las técnicas

En relación a la capacidad discriminatoria de las técnicas utilizadas en muestras de alimento, la Esp fue 1 para todas las técnicas utilizadas. Los valores de Se y Pre fueron 1 para el método MSRV-alimento en los serotipos móviles. Los mismos parámetros estuvieron entre 0,58 a 0,93 para los métodos TT-alimento y PCR, respectivamente. Los tres métodos empleados mostraron valores de Se y Pre menores a 0,6 para las cepas inmóviles (Tabla 2.6).

En la Tabla 2.7 se muestran los valores de VPP y los VPN para todas las cepas ensayadas. El VPP fue 1 para todas las cepas de *Salmonella* en las tres metodologías, excepto para *S. Pullorum* 90/142, *S. Gallinarum* 80/111 y *S. Gallinarum* 03/121 en el método

MSRV. Por otro lado, los VPN variaron entre 0,09 y 0,25; y entre 0,09 a 0,18 para los serotipos móviles e inmóviles, respectivamente.

Al analizar los límites de detección de cada técnica, todos los serotipos móviles de *Salmonella* sp. se recuperaron en las concentraciones más bajas ensayadas en todos los métodos, excepto para *S. Livingstone*, que fue recuperada desde 2×10^2 UFC/25g de alimento en el método TT-alimento (Tabla 2.8). Para las cepas inmóviles, los límites de detección variaron entre $2,5 \times 10^4$ y $6,2 \times 10^6$ UFC/25g en los métodos TT-alimento y MSRV-alimento (Tabla 2.9), respectivamente. Sin embargo, el método de PCR fue capaz de detectar algunas de las cepas desde $2,5$ a $7,4 \times 10^2$ UFC/25 g de alimento.

No hubo diferencias significativas en términos de Se y Pre entre los medios selectivos-diferenciales agarizados empleados en cada método bacteriológico en todos los serotipos ensayados. En el caso de las cepas móviles, los 4 medios mostraron altos valores de Se y Pre ($> 0,87$) (Tabla 2.10). Sin embargo, estos parámetros fueron menores a 0,30 en las cepas inmóviles (Tabla 2.11).

En relación a los dos tiempos de incubación en el método TT-alimento (TT 1° y TT2°), los valores de Se y Pre fueron más altos en TT1° que en TT 2° para *S. Enteritidis* PT1 y *S. Livingstone*. Además, la capacidad discriminatoria para los medios VB y MC disminuyó luego de 6 días, en comparación a la primera siembra (TT1°) en esas dos cepas. Los medios XLDT y EF18 mantuvieron su capacidad discriminatoria en ambos tiempos de siembra en 3 de las 4 cepas móviles. Para las cepas inmóviles, la Se y Pre fueron nulas o con valores cercanos a cero en la mayoría de los casos y medios selectivos empleados (Tabla 2.11).

La Tabla 2.12 muestra los VPP y VPN de los medios agarizados para las cepas móviles, con detalle para el método TT. El VPP fue 1 para todas las cepas, excepto en *S. Livingstone* para TT2°. Por otro lado, los VPP fueron 1 en la mayoría de las cepas inmóviles para TT 1° (tabla 1.13). Para TT2° no pudo calcularse dicho parámetro en ambos métodos bacteriológicos, (indeterminado: 0/0). El VPN estuvo entre 0,11 y 1 para los serotipos móviles; en el caso de las cepas inmóviles, este valor fue muy bajo (Tabla 2.12 y 2.13).

Tabla 2.6. Sensibilidad (Se) y Precisión (Pre) de los métodos tetrionato (TT-alimento), Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para cada serotipo (móviles e inmóviles) de *Salmonella* en alimento para aves contaminado artificialmente. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro.

Cepas	Se			Pre		
	TT-alimento	MSRV-alimento	PCR	TT	TT-alimento	MSRV-alimento
<i>S. Enteritidis</i> PT 1	1 ^{a,1} (0,92-0,99)	1 ^{a,1} (0,92-0,99)	0,58 ^{b,1} (0,26-0,82)	1 ^{a,1} (0,92-0,99)	1 ^{a,1} (0,92-0,99)	0,64 ^{b,1} (0,34-0,84)
<i>S. Typhimurium</i> 06/11	1 ^{a,1} (0,95-0,99)	1 ^{a,1} (0,95-0,99)	0,95 ^{a,2} (0,80-0,99)	1 ^{a,1} (0,95-0,99)	1 ^{a,1} (0,95-0,99)	0,95 ^{a,2} (0,81-0,99)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	0,93 ^{a,1} (0,76-0,99)	1 ^{a,1} (0,93-0,99)	0,81 ^{a,2} (0,61-0,96)	0,94 ^{a,1} (0,78-0,99)	1 ^{a,1} (0,94-0,99)	0,83 ^{a,2} (0,57-0,95)
<i>S. Livingtone</i> CUB 52/10	0,55 ^{b,2} (0,40-0,84)	1 ^{a,1} (0,93-0,99)	0,93 ^{a,2} (0,76-0,99)	0,60 ^{b,2} (0,40-0,84)	1 ^{a,1} (0,94-0,99)	0,94 ^{a,2} (0,78-0,99)
<i>S. Pullorum</i> 90/142	0,10 ^{a,3} (0,06-0,36)	0 ^{a,2}	0,35 ^{b,1} (0,17-0,56)	0,22 ^{a,3} (0,06-0,36)	0,09 ^{b,2} (0,01-0,25)	0,40 ^{a,1} (0,22-0,60)
<i>S. Gallinarum</i> 93/110	0,10 ^{a,3} (0,10-0,27)	0,15 ^{a,2,3} (0,04-0,34)	0,55 ^{b,1} (0,34-0,74)	0,22 ^{a,3} (0,06-0,36)	0,22 ^{a,2} (0,09-0,42)	0,59 ^{b,1} (0,39-0,77)
<i>S. Gallinarum</i> 88/322	0,25 ^{a,3} (0,10-0,45)	0,20 ^{a,3} (0,06-0,39)	0,55 ^{b,1} (0,34-0,74)	0,31 ^{a,3} (0,15-0,51)	0,27 ^{a,2} (0,12-0,47)	0,59 ^{b,1} (0,39-0,77)
<i>S. Gallinarum</i> 80/111	0,15 ^{ab,3} (0,04-0,34)	0 ^{a,2}	0,20 ^{b,3} (0,06-0,39)	0,22 ^{a,3} (0,09-0,42)	0,09 ^{b,2} (0,01-0,25)	0,27 ^{a,3} (0,12-0,47)
<i>S. Gallinarum</i> 81/86	0,40 ^{a,2} (0,21-0,60)	0,04 ^{b,2} (0-0,20)	0,45 ^{a,1} (0,25-0,65)	0,45 ^{a,3} (0,26-0,65)	0,13 ^{b,2} (0,03-0,31)	0,50 ^{a,1} (0,30-0,69)
<i>S. Gallinarum</i> 03/121	0,15 ^{a,3} (0,04-0,34)	0 ^{a,2}	0,50 ^{b,1} (0,29-0,70)	0,22 ^{a,3} (0,09-0,42)	0,09 ^{b,2} (0,01-0,25)	0,54 ^{c,1} (0,34-0,73)

^{a, b} Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente distintos para cada parámetro ($P < 0,05$). ^{1,2,3} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Tabla 2.7. Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para cada cepa (móvil e inmóvil) de *Salmonella* inoculada en alimento contaminado artificialmente, de acuerdo a los métodos tetrionato (TT-alimento), Rappaport-Vassiliadis semosólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro.

Cepa	VPP			VPN		
	TT-alimento	MSRV-alimento	PCR	TT-alimento	MSRV-alimento	PCR
<i>S. Enteritidis</i> PT1	1 ^{a1} (0,91-0,99)	1 ^{a1} (0,91-0,99)	1 ^{a1} (0,86-0,99)	1 ^{a1} (0,51-0,98)	1 ^{a1} (0,51-0,98)	0,27 ^{b1} (0,06-0,62)
<i>S. Typhimurium</i> 06/11	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,94-0,99)	1 ^{a1} (0,51-0,98)	1 ^{a1} (0,51-0,98)	0,67 ^{a1} (0,09-0,90)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,92-0,99)	0,67 ^{ab1} (0,22-0,95)	1 ^{b1} (0,51-0,98)	0,40 ^{a1} (0,10-0,76)
<i>S. Livingstone</i> CUB 52/10	1 ^{a1} (0,90-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,25 ^{a1} (0,05-0,56)	1 ^{b1} (0,51-0,98)	0,67 ^{ab1} (0,22-0,95)
<i>S. Pullorum</i> 90/142	1 ^{a1} (0,51-0,98)	IND*	1 ^{a1} (0,86-0,99)	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0,09 ^{a2} (0,01-0,25)	0,13 ^{a1} (0,02-0,35)
<i>S. Gallinarum</i> 93/110	1 ^{a1} (0,51-0,98)	1 ^{a1} (0,67-0,99)	1 ^{a1} (0,91-0,99)	0,10 ^{a1} (0,01-0,29)	0,11 ^{a2} (0,01-0,28)	0,18 ^{a1} (0,03-0,45)
<i>S. Gallinarum</i> 88/322	1 ^{a1} (0,80-0,99)	1 ^{a1} (0,75-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,12 ^{a1} (0,02-0,31)	0,11 ^{a2} (0,01-0,30)	0,18 ^{a1} (0,03-0,45)
<i>S. Gallinarum</i> 80/111	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,75-0,99)	0,11 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a2} (0,01-0,25)	0,11 ^{a1} (0,01-0,28)
<i>S. Gallinarum</i> 81/86	1 ^{a1} (0,87-0,99)	1 ^{a1} (0,02-0,97)	1 ^{a1} (0,89-0,99)	0,14 ^{a1} (0,02-0,37)	0,11 ^{a2} (0,01-0,26)	0,15 ^{a1} (0,02-0,39)
<i>S. Gallinarum</i> 03/121	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,02-0,39)	0,11 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a2} (0,01-0,25)	0,17 ^{a1} (0,03-0,42)

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente distintos para cada parámetro (P < 0,05).

^{1,2} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05)

* IND: Indeterminado (0/0)

Tabla 2.8. Resultados obtenidos al inocular serotipos móviles de *Salmonella* en alimento para aves y posterior aislamiento mediante los métodos tetrionato (TT-alimento), Rappaport-Vassiliadis semosólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	Rango de inoculación (UFC/25g)	N° de muestras positivas/N° total de muestras según la metodología para detectar <i>Salmonella</i> sp.			
		TT 1°	TT 2°	MSRV	PCR
<i>S.Enteritidis</i> PT1	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	8	3/4	3/4	4/4	1/4
	79	4/4	4/4	4/4	3/4
	$7,9 \times 10^2$	4/4	4/4	4/4	3/4
<i>S.Typhimurium</i> 06/11	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	8	4/4	4/4	4/4	3/4
	83	4/4	4/4	4/4	4/4
	$8,3 \times 10^2$	4/4	4/4	4/4	4/4
	$8,3 \times 10^3$	4/4	4/4	4/4	4/4
	$8,3 \times 10^4$	4/4	4/4	4/4	4/4
<i>S.Kentucky</i> CUB 19/08	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	18	3/4	3/4	4/4	1/4
	$1,8 \times 10^2$	4/4	4/4	4/4	4/4
	$1,8 \times 10^3$	4/4	4/4	4/4	4/4
	$1,8 \times 10^4$	4/4	3/4	4/4	4/4
<i>S.Livingstone</i> CUB 52/10	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	20	0/4	0/4	4/4	4/4
	$2,0 \times 10^2$	3/4	0/4	4/4	4/4
	$2,0 \times 10^3$	3/4	1/4	4/4	4/4
	$2,0 \times 10^4$	4/4	0/4	4/4	3/4

Tabla 2.9. Resultados obtenidos al inocular serotipos inmóviles de *Salmonella* en alimento para aves y posterior aislamiento mediante las técnicas tetracionato(TT-alimento) Rappaport-Vassiliadis semosólido modificado (MSRV-alimento) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	(UFC/25g)	N° de muestras positivas/N° total de muestras según la metodología para detectar <i>Salmonella</i> sp.			
		TT 1°	TT 2°	MSRV-alimento	PCR
<i>S. Pullorum</i> 90/142	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	1,4 x 10 ²	0/4	0/4	0/4	0/4
	1,4 x 10 ³	0/4	0/4	0/4	0/4
	1,4 x 10 ⁴	0/4	0/4	0/4	0/4
	1,4 x 10 ⁵	0/4	0/4	0/4	3/4
	1,4 x 10 ⁶	1/4	0/4	0/4	4/4
<i>S. Gallinarum</i> 93/110	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	74	0/4	0/4	0/4	0/4
	7,4 x 10 ²	0/4	0/4	0/4	1/4
	7,4 x 10 ³	0/4	0/4	0/4	3/4
	7,4 x 10 ⁴	1/4	0/4	0/4	3/4
<i>S. Gallinarum</i> 88/322	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	25	0/4	0/4	0/4	0/4
	2,5 x 10 ²	0/4	0/4	0/4	2/4
	2,5 x 10 ³	0/4	0/4	0/4	2/4
	2,5 x 10 ⁴	1/4	0/4	0/4	3/4
<i>S. Gallinarum</i> 80/111	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	6,2 x 10 ²	0/4	0/4	0/4	0/4
	6,2 x 10 ³	0/4	0/4	0/4	0/4
	6,2 x 10 ⁴	0/4	0/4	0/4	0/4
	6,2 x 10 ⁵	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>S. Gallinarum</i> 81/86	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	2,3 x 10 ³	0/4	0/4	0/4	0/4
	2,3 x 10 ⁴	0/4	0/4	0/4	0/4
	2,3 x 10 ⁵	1/4	0/4	0/4	1/4
	2,3 x 10 ⁶	3/4	0/4	0/4	4/4
<i>S. Gallinarum</i> 03/121	0	0/2	0/2	0/2	0/2
	1,4 x 10 ²	0/4	0/4	0/4	0/4
	1,4 x 10 ³	0/4	0/4	0/4	0/4
	1,4 x 10 ⁴	0/4	0/4	0/4	3/4
	1,4 x 10 ⁵	0/4	0/4	0/4	3/4
	1,4 x 10 ⁶	3/4	2/4	0/4	4/4

Tabla 2.10. Sensibilidad (Se) y precisión (Pre) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) en las cepas móviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro.

Cepas	Medio	Se			Pre		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
<i>S. Enteritidis</i> PT1	BG	0,83 ^{a1} (0,55-0,98)	0,41 ^{b1} (0,1-0,65)	1 ^{a1} (0,91-1)	0,85 ^{a1} (0,60-0,98)	0,50 ^{b1} (0,20-0,72)	1 ^{a1} (0,93-1)
	XLDT	0,91 ^{a1} (0,68-1)	0,83 ^{a2} (0,55-0,98)	1 ^{a1} (0,91-1)	0,92 ^{a1} (0,72-1)	0,85 ^{a2} (0,60-0,98)	1 ^{a1} (0,93-1)
	EF18	0,91 ^{a1} (0,68-1)	0,75 ^{a2} (0,43-0,93)	1 ^{a1} (0,91-1)	0,92 ^{a1} (0,72-1)	0,78 ^{a2} (0,51-0,94)	1 ^{a1} (0,93-1)
	MC	0,91 ^{a1} (0,68-1)	0,41 ^{b1} (0,1-0,65)	1 ^{a1} (0,91-1)	0,92 ^{a1} (0,72-1)	0,50 ^{b1} (0,20-0,72)	1 ^{a1} (0,93-1)
<i>S.</i> <i>Typhimurium</i> 06/11	BG	0,95 ^{a1} (0,80-0,99)	0,85 ^{a1} (0,68-0,97)	1 ^{a1} (0,91-1)	0,95 ^{a1} (0,82-0,99)	0,86 ^{a1} (0,65-0,96)	1 ^{a1} (0,93-1)
	XLDT	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,91-1)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,93-1)
	EF18	1 ^{a1} (0,95-0,99)	0,90 ^{a1} (0,74-0,99)	1 ^{a1} (0,91-1)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	0,90 ^{a1} (0,72-0,98)	1 ^{a1} (0,93-1)
	MC	1 ^{a1} (0,95-0,99)	0,70 ^{a1} (0,50-0,88)	1 ^{a1} (0,91-1)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	0,72 ^{a1} (0,46-0,86)	1 ^{a1} (0,93-1)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	BG	0,62 ^{a1} (0,34-0,82)	0,56 ^{a1} (0,28-0,77)	0,93 ^{b1} (0,78-0,99)	0,66 ^{a1} (0,40-0,84)	0,61 ^{a1} (0,34-0,80)	0,94 ^{b1} (0,76-0,99)
	XLDT	0,93 ^{a2} (0,76-0,99)	0,87 ^{a2} (0,65-0,98)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,94 ^{a2} (0,78-0,99)	0,88 ^{a2} (0,69-0,98)	1 ^{a1} (0,94-0,99)
	EF18	0,93 ^{a2} (0,76-0,99)	0,87 ^{a2} (0,65-0,98)	0,93 ^{a1} (0,78-0,99)	0,94 ^{a2} (0,78-0,99)	0,88 ^{a2} (0,69-0,98)	0,94 ^{a1} (0,76-0,99)
	MC	0,87 ^{a2} (0,65-0,98)	0,62 ^{a2} (0,34-0,82)	0,93 ^{a1} (0,78-0,99)	0,88 ^{a2} (0,69-0,98)	0,66 ^{b2} (0,40-0,84)	0,94 ^{a1} (0,76-0,99)
<i>S. Livingstone</i> CUB 52/10	BG	0,18 ^{a1} (0,06-0,43)	0,06 ^{b1} (0,01-0,28)	0,88 ^{c1} (0,76-0,99)	0,27 ^{a1} (0,05-0,47)	0,16 ^{a1} (0,06-0,39)	0,94 ^{b1} (0,78-0,99)
	XLDT	0,37 ^{a1} (0,11-0,59)	0 ^{b1}	0,88 ^{c1} (0,76-0,99)	0,44 ^{a1} (0,18-0,65)	0 ^{b1}	0,94 ^{c1} (0,78-0,99)
	EF18	0,37 ^{a1} (0,11-0,59)	0 ^{b1}	0,88 ^{c1} (0,76-0,99)	0,44 ^{a1} (0,18-0,65)	0 ^{b1}	0,94 ^{c1} (0,78-0,99)
	MC	0,18 ^{a1} (0,06-0,43)	0 ^{b1}	1 ^{c1} (0,93-0,99)	0,27 ^{a1} (0,05-0,47)	0 ^{b1}	1 ^{c1} (0,94-0,99)

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

^{1,2} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

VB= agar verde brillante; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato con tergitol; MC=agar MacConkey; EF-18= agar EF-18

Tabla 2.11. Sensibilidad (Se) y precisión (Pre) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrationato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) en las cepas inmóviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro.

Cepa	Medio	Se			Pre		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
S.P. 90/142	BG	0 ^{a1}	0 ^a	0 ^{a1}	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	0,05 ^{a1} (0-0,20)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	0,05 ^{a1} (0-0,20)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
S.G. 93/110	BG	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,05 ^{a1} (0-0,20)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)
	XLDT	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0 ^{a1}	0,05 ^{a1} (0-0,20)	0,18 ^{a1} (0,06-0,36)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)
	EF18	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0 ^{a1}	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0,18 ^{a1} (0,06-0,36)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,22 ^{a1} (0-0,42)
	MC	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,05 ^{a1} (0-0,20)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)
S.G. 88/322	BG	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,18 ^{a1} (0,06-0,36)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0 ^{a1}	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0,22 ^{a1} (0,03-0,31)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,22 ^{a1} (0,03-0,34)
	EF18	0,20 ^{a2} (0,06-0,39)	0 ^{b1}	0,20 ^{a2} (0,06-0,39)	0,27 ^{a1} (0,12-0,47)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,27 ^{a1} (0,12-0,47)
	MC	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,18 ^{a1} (0,06-0,36)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
S.G. 80/111	BG	0,05 ^{a1} (0-0,20)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,18 ^{a1} (0,06-0,36)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	0,05 ^{a1} (0,01-0,20)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,13 ^{a1} (0,03-0,31)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	0,15 ^{a1} (0,04-0,34) ^a	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,22 ^{a1} (0,09-0,42)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
S. G. 81/86	BG	0,40 ^{a1} (0,16-0,59)	0 ^{b1}	0 ^{b1}	0,45 ^{a1} (0,22-0,64)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)
	XLDT	0,35 ^{a1} (0,12-0,54)	0 ^{b1}	0 ^{b1}	0,40 ^{a1} (0,18-0,59)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)
	EF18	0,35 ^{a1} (0,12-0,54)	0 ^{b1}	0 ^{b1}	0,40 ^{a1} (0,18-0,59)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)
	MC	0,35 ^{a1} (0,12-0,54)	0 ^{b1}	0,05 ^{b1} (0-0,20)	0,40 ^{a1} (0,18-0,59)	0,09 ^{b1} (0,01-0,25)	0,13 ^{b1} (0,03-0,31)
S.G. 03/121	BG	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,22 ^{a1} (0,09-0,42)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,22 ^{a1} (0,09-0,42)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0,10 ^{a1} (0,06-0,36)	0 ^{a1}	0,22 ^{a1} (0,09-0,42)	0,18 ^{a1} (0,01-0,27)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	0,15 ^{a1} (0,04-0,34)	0 ^{a1}	0 ^{a1}	0,22 ^{a1} (0,09-0,42)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)

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

^{1,2} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

VB= agar verde brillante; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato con tergitol; MC=agar MacConkey; EF-18= agar EF-18

Tabla 2.12. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetracionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) en las cepas móviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro.

Cepas	Medio	VPP			VPN		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
<i>S. Enteritidis</i> PT1	BG	1 ^{a1} (0,90-0,99)	1 ^{a1} (0,80-0,99)	1 ^{a1} (0,91-0,99)	0,50 ^{a1} (0,14-0,85)	0,22 ^{a1} (0,04-0,52)	1 ^{b1} (0,51-0,98)
	XLDT	1 ^{a1} (0,91-0,99)	1 ^{a1} (0,90-0,99)	1 ^{a1} (0,91-0,99)	0,67 ^{ab1} (0,22-0,95)	0,50 ^{a1} (0,14-0,85)	1 ^{b1} (0,51-0,98)
	EF18	1 ^{a1} (0,91-0,99)	1 ^{a1} (0,89-0,99)	1 ^{a1} (0,91-0,99)	0,67 ^{ab1} (0,22-0,95)	0,40 ^{a1} (0,10-0,76)	1 ^{b1} (0,51-0,98)
	MC	1 ^{a1} (0,91-0,99)	1 ^{a1} (0,80-0,99)	1 ^{a1} (0,91-0,99)	0,67 ^{ab1} (0,22-0,95)	0,22 ^{a1} (0,04-0,52)	1 ^{b1} (0,51-0,98)
<i>S.</i> <i>Typhimurium</i> 06/11	BG	1 ^{a1} (0,94-0,99)	1 ^{a1} (0,94-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)	0,40 ^{a1} (0,10-0,76)	1 ^{a1} (0,95-0,99)
	XLDT	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,29-0,99)	1 ^{a2} (0,29-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)
	EF18	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,94-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,29-0,99)	0,50 ^{b3} (0,14-0,85)	1 ^{a1} (0,95-0,99)
	MC	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,95-0,99)	1 ^{a1} (0,29-0,99)	0,25 ^{b4} (0,05-0,56)	1 ^{a1} (0,95-0,99)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	BG	1 ^{a1} (0,90-0,99)	1 ^{a1} (0,89-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,25 ^{a1} (0,07-0,60)	0,22 ^{a1} (0,04-0,52)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)
	XLDT	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)	0,50 ^{a1} (0,14-0,85)	1 ^{a1} (0,29-0,99)
	EF18	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)	0,50 ^{a1} (0,14-0,85)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)
	MC	1 ^{a1} (0,93-0,99)	1 ^{a1} (0,90-0,99)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,50 ^{a1} (0,14-0,85)	0,25 ^{a1} (0,07-0,60)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)
<i>S. Livingstone</i> CUB 52/10	BG	1 ^{a1} (0,67-0,99)	1 ^{a1} (0,02-0,97)	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,13 ^{a1} (0,02-0,35)	0,11 ^{a1} (0,02-0,31)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)
	XLDT	1 ^{a1} (0,83-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,16 ^{a1} (0,03-0,42)	0,11 ^{a1} (0,02-0,31)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)
	EF18	1 ^{a1} (0,83-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,16 ^{a1} (0,03-0,42)	0,11 ^{a1} (0,02-0,31)	0,66 ^{a1} (0,22-0,95)
	MC	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,93-0,99)	0,13 ^{a1} (0,02-0,35)	0,11 ^{a1} (0,02-0,31)	1 ^{b1} (0,29-0,99)

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

^{1,2} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

VB= agar verde brillante; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato con tergitol; MC=agar MacConkey; EF-18= agar EF-18

IND: indeterminado (0/0).

Tabla 2.13. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-alimento) y Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-alimento) en las cepas inmóviles de *Salmonella*. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente). Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 % para cada parámetro.

Cepa	Medio	VPP			VPN		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
S.P. 90/142	BG	IND*	IND*	IND*	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	1 ¹ (0,02-0,97)	IND*	IND*	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	1 ¹ (0,02-0,97)	IND*	IND*	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	IND*	IND*	IND*	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
S.G. 93/110	BG	IND*	IND*	1 ¹ (0,02-0,97)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)
	XLDT	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,02-0,97)	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)
	EF18	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,67-0,99)	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)
	MC	IND*	IND*	1 ¹ (0,02-0,97)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)
S.G. 88/322	BG	1 ¹ (0,51-0,98)	IND*	IND*	0,11 ^{a1} (0,01-0,27)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,67-0,99)	0,11 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)
	EF18	1 ^{a1} (0,75-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,75-0,99)	0,11 ^{a1} (0,01-0,30)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,11 ^{a1} (0,01-0,30)
	MC	1 ¹ (0,51-0,98)	IND*	IND*	0,11 ^{a1} (0,01-0,27)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	IND*
S.G. 80/111	BG	1 ¹ (0,02-0,97)	IND*	IND*	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	1 ¹ (0,51-0,98)	IND*	IND*	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	1 ¹ (0,02-0,97)	IND*	IND*	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	1 ¹ (0,02-0,97)	IND*	IND*	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
S.G. 81/86	BG	1 ¹ (0,87-0,99)	IND*	IND*	0,14 ^{a1} (0,02-0,37)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	1 ¹ (0,86-0,99)	IND*	IND*	0,13 ^{a1} (0,02-0,35)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	1 ¹ (0,86-0,99)	IND*	IND*	0,13 ^{a1} (0,02-0,35)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	1 ^{a1} (0,86-0,99)	IND*	1 ^{a1} (0,02-0,97)	0,13 ^{a1} (0,02-0,35)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,26)
S.G. 03/121	BG	1 ^{a1} (0,67-0,99)	IND*	IND*	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	XLDT	1 ¹ (0,67-0,99)	IND*	IND*	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	EF18	1 ^{a1} (0,67-0,99)	1 ^a (0,51-0,98)	IND*	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)	0,10 ^{a1} (0,01-0,27)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)
	MC	1 ¹ (0,67-0,99)	IND*	IND*	0,10 ^{a1} (0,01-0,28)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)	0,09 ^{a1} (0,01-0,25)

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

^{1, 2} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

*IND= indeterminado

VB= agar verde brillante; XLDT= agar xilosa lisina desoxicolato con tergitol; MC=agar MacConkey; EF-18= agar EF-18

En general, los medios VB y MC mostraron mayor crecimiento de flora competitiva que los medios XLDT y EF-18, con algunas placas sin colonias compatibles con *Salmonella*. Sin embargo, mediante las pruebas bioquímicas y la aglutinación, pudo confirmarse la presencia de las cepas inoculadas.

El análisis estadístico mediante el coeficiente kappa mostró buena concordancia entre los métodos MSR-V-alimento y TT-alimento; y entre MSR-V-alimento y PCR para las cepas móviles (Tabla 2.14). La concordancia fue débil entre los métodos TT y PCR para estos últimos serotipos. Para las cepas inmóviles, la concordancia fue pobre para las comparaciones TT -MSR-V y MSR-V-PCR; mientras que para PCR-TT la concordancia fue débil.

Tabla 2.14. Coeficiente de concordancia (Kappa) entre los métodos MSR-V-alimento, TT-alimento y PCR en muestras de alimento

Cepas de <i>Salmonella</i>	Comparación entre métodos	Coeficiente Kappa
Móviles	TT-alimento-MSR-V-alimento	0,65*
	MSR-V-alimento -PCR	0,61*
	PCR- TT-alimento	0,57*
Inmóviles	TT-alimento-MSR-V-alimento	0,20*
	MSR-V-alimento -PCR	0,18*
	PCR- TT-alimento	0,44*

* Indica que el coeficiente kappa es estadísticamente distinto de cero ($P < 0,05$).

2.2.2. Sección II. Detección de *Salmonella* en agua de bebida de aves de corral.

Todas las muestras de agua tuvieron un valor de cloro libre y total menores a 0,1 mg/ml y 0,1 mg/l, respectivamente. Con relación a la capacidad discriminatoria, la Esp fue 1 para todos los métodos estudiados. El resto de los parámetros evidenciaron diferencias significativas entre las cepas móviles e inmóviles. La Se y Pre fueron 1 para todas las cepas móviles en los métodos ensayados (Tabla 2.15). En relación a las cepas inmóviles, la Se fue 0 en el método TT-agua y menor a 0.68 en los otros métodos. La Pre fue menor a 0,74 para estas cepas. Solamente en la cepa de *S. Gallinarum* CUB 55/10, la Se y Pre fue más alta en MSR-V-agua que en TT-agua y APTdc-PCR.

La Tabla 2.16 muestra los VPP y VPN. Estos parámetros fueron de 1 en todas las cepas móviles de *Salmonella* en los tres métodos ensayados. Las cepas inmóviles tuvieron un VPP de 1 en el método APTdc-PCR. Dicho parámetro no pudo ser calculado en el método

TT para estas cepas inmóviles debido a la ausencia de VP y FP. Por otro lado, el VPN estuvo entre 0,20 y 0,43 para los tres métodos.

Con respecto a los límites de detección, todas las cepas móviles fueron recuperadas en la concentración más baja en todos los métodos, desde 4 a 7 UFC/25 ml (Tabla 2.17). En cuanto a las cepas inmóviles, ninguna fue detectada por el método TT-agua; solamente *S. Gallinarum* CUB 55/10 pudo ser recuperada a partir de la concentración de $1,1 \times 10^{-1}$ UFC/25 ml utilizando el método MSRV-agua. En contraste, mediante la técnica APTdc-PCR sólo se pudieron detectar *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* a partir una concentración de $1,1 \times 10^{-4}$ UFC/25 ml.

Considerando a todas las cepas estudiadas excepto *S. Gallinarum* CUB 55/10, los tres medios agarizados selectivos-diferenciales, que se utilizaron empleando ambos métodos bacteriológicos, no mostraron ninguna diferencia significativa de Se y Pre (Tabla 2.18). Los tres medios de cultivo empleados mostraron valores de Se y Pre desde 0,83 a 1 para todas las cepas móviles. Sin embargo, para *S. Pullorum* ATCC 13036, los medios agarizados tuvieron una Se y Pre de 0 a 0,20, respectivamente. Por otro lado, para *S. Gallinarum* estos parámetros fueron más altos en el método MSRV-agua que con el método TT-agua. En cuanto a los dos tiempos de incubación del método TT-agua (TT1° y TT2°), la Se y Pre fueron similares. La Se tomó valores desde 0,83 a 1 y la Pre desde 0,87 a 1 para las cepas móviles. Por otro lado, la Se fue de 0 y la Pre de 0,20 para las cepas de *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036, en los tres medios selectivos usados.

Tabla 2.15. Sensibilidad y precisión de los métodos Tetrionato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos del cultivo de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada doble concentración (APTdc-PCR) para cada cepa móvil e inmóvil de *Salmonella* en muestras de agua contaminada artificialmente. Valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %.

Cepas	Sensibilidad			Precisión		
	TT-agua	MSRV-agua	APTdc-PCR	TT-agua	MSRV-agua	APTdc-PCR
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)
<i>S. Infantis</i> CUB 08/08	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	0,00 ^{a, B} (0,00-0,60)	0,00 ^{a, B} (0,00-0,60)	0,17 ^{a, B} (0,05-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,33 ^{a, B} (0,15-0,58)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 03/121	0,00 ^{a, B} (0,00-0,60)	0,67 ^{b, C} (0,38-0,86)	0,17 ^{a, B} (0,05-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,73 ^{b, C} (0,47-0,88)	0,33 ^{a, B} (0,15-0,58)

^{a, b} Valores con letras minúsculas en la misma fila son significativamente diferentes para cada parámetro ($P < 0,05$).

^{A- C} Valores con letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabla 2.16. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) de los métodos Tetrionato (T⁺T-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos del cultivo de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada doble concentración (APTdc-PCR) para cada cepa móvil e inmóvil de *Salmonella* en muestras de agua contaminada artificialmente. Valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %.

Cepas	VPP			VPN		
	T ⁺ T-agua	MSRV-agua	APTdc-PCR	T ⁺ T-agua	MSRV-agua	APTdc-PCR
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)
<i>S. Infantis</i> CUB 08/08	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,39-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	IND ¹	IND	1,00 ^A (0,29-0,99)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,23 ^{a,B} (0,08-0,50)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 03/121	IND	1,00 ^{a,A} (0,66-0,99)	1,00 ^A (0,29-0,99)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,43 ^{a,B} (0,15-0,75)	0,23 ^{a,B} (0,08-0,50)

^{a, b} Valores con letras minúsculas en la misma fila son significativamente diferentes para cada parámetro ($P < 0,05$).

^{A-C} Valores con letras mayúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

¹IND = indeterminado (0/0)

Tabla 2.17. Resultados obtenidos al inocular serotipos *Salmonella* en muestras de agua de bebida para aves y posterior detección mediante las técnicas Tetraciónato (TT-agua), Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) y Reacción en Cadena de la Polimerasa con templados obtenidos desde cultivo de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada doble concentración (APTdc-PCR) Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	UFC/25 ml	Metodología para detectar <i>Salmonella</i> N° de muestras positivas/N° total de muestras			
		TT 1°	TT 2°	MSRV	APTdc-PCR
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	7,0 x 10 ⁰	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,6 x 10 ¹	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,6 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,6 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	4,0 x 10 ⁰	3/3	3/3	3/3	3/3
	4,2 x 10 ¹	3/3	3/3	3/3	3/3
	4,2 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	4,2 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>S. Infantis</i> CUB 08/08	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	5,0 x 10 ⁰	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 ¹	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	7,0 x 10 ⁰	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,6 x 10 ¹	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,6 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,6 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,2 x 10 ¹	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,2 x 10 ²	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,2 x 10 ³	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,2 x 10 ⁴	0/3	0/3	0/3	2/3
<i>S. Gallinarum</i> CUB 03/121	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,1 x 10 ¹	0/3	0/3	1/3	0/3
	1,1 x 10 ²	0/3	0/3	1/3	0/3
	1,1 x 10 ³	0/3	0/3	3/3	0/3
	1,1 x 10 ⁴	0/3	0/3	3/3	2/3

Tabla 2.18 Sensibilidad y precisión para los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetrionato (TT-agua) y Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) para las cepas de *Salmonella* inoculadas en agua de bebida para aves. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	Medio	Sensibilidad			Precisión		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	XLD	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	EF18	0,83 ^{a,A} (0,54-0,94)	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	1,00 ^A (0,75-0,99)	0,87 ^{a,A} (0,61-0,95)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,98)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	XLDT	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	1,00 ^A (0,75-0,99)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,95)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,98)	1,00 ^A (0,79-0,99)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13036	XLD	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,98)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	EF18	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,98)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	XLDT	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	0,92 ^{a,A} (0,63-0,98)	1,00 ^A (0,75-0,99)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,98)	0,93 ^{a,A} (0,69-0,98)	1,00 ^A (0,79-0,99)
<i>S. Infantis</i> CUB 08/08	XLD	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	EF18	1,00 ^{a,B} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	XLDT	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	XLD	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	EF18	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
	XLDT	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^{a,A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,79-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	XLD	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^B (0,00-0,24)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^B (0,07-0,45)
	EF18	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^B (0,00-0,24)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^B (0,07-0,45)
	XLDT	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^B (0,00-0,24)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^B (0,07-0,45)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 03/121	XLD	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,42 ^{C,D} (0,19-0,68)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,53 ^{C,D} (0,29-0,75)
	EF18	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,67 ^C (0,38-0,86)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,73 ^C (0,47-0,88)
	XLDT	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,00 ^{a,B} (0,00-0,24)	0,25 ^D (0,09-0,53)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a,B} (0,07-0,45)	0,40 ^D (0,19-0,64)

^{a,b} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente distintos para cada parámetro ($P < 0,05$).

^{A,B} Valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

XLD: agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄ = XLD con tergitol; EF-18 = agar EF-18

Tabla 2.19. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios de cultivo agarizados en los métodos tetrionato (TT-agua) y Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV-agua) para las cepas de *Salmonella* inoculadas en agua de bebida para aves. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	Medio	VPP			VPN		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	XLD	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,79-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	EF18	1,00 ^{a, A} (0,71-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,71-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	0,60 ^{a, A} (0,22-0,88)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	XLDT	1,00 ^{a, A} (0,73-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,73-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	1,00 ^A (0,39-0,99)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13036	XLD	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,73-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	EF18	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,73-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	XLDT	1,00 ^{a, A} (0,73-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,73-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	0,75 ^{a, A} (0,28-0,94)	1,00 ^A (0,39-0,99)
<i>S. Infantis</i> CUB 08/08	XLD	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	EF18	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	XLDT	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
<i>S. Kentucky</i> CUB 19/08	XLD	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	EF18	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
	XLDT	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,75-0,99)	1,00 ^A (0,75-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^{a, A} (0,39-0,99)	1,00 ^A (0,39-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	XLD	IND*	IND	IND	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^B (0,07-0,45)
	EF18	IND	IND	IND	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^B (0,07-0,45)
	XLDT	IND	IND	IND	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^B (0,07-0,45)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 03/121	XLD	IND	IND	1,00 ^A (0,54-0,99)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,30 ^B (0,10-0,60)
	EF18	IND	IND	1,00 ^A (0,66-0,99)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,43 ^B (0,15-0,75)
	XLDT	IND	IND	1,00 ^A (0,39-0,99)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,20 ^{a, B} (0,07-0,45)	0,25 ^B (0,09-0,53)

^{a, b}Valores con letras minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente distintos para cada parámetro ($P < 0,05$).

^{A, B}Valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

XLD: agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄ = XLD con tergitol; EF-18 = agar EF-18

IND* = indeterminado

La Tabla 2.19 muestra los VPP y VPN de cada medio agarizado selectivo-diferencial para las cepas móviles e inmóviles. Los VPP fueron 1 para todas las cepas móviles de *Salmonella*. Por otro lado, el VPP fue indeterminado (0/0) para las cepas inmóviles, excepto *S. Gallinarum* en el método MSR/V. El VPN estuvo entre 0,60 y 1 para las cepas móviles y fue muy bajo (0,20-0,43) para las cepas inmóviles.

Los valores de concordancia se muestran en la Tabla 2.20. La concordancia fue excelente entre los tres métodos para las cepas móviles. Para las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, la concordancia fue pobre entre MSR/V y PCR; no hubo concordancia entre el método TT al compararse con el método MSR/V y PCR.

Tabla 2.20. Coeficientes Kappa mostrando grado de concordancia entre todos los métodos estudiados para la detección de *Salmonella* en agua de bebida.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Comparación entre los métodos ¹	Coefficiente kappa
móviles	TT-agua/ MSR/V-agua	1.00*
	TT-agua - APTdc-PCR	1.00*
	MSR/V-agua - APTdc-PCR	1.00*
inmóviles	TT-agua/ MSR/V-agua	0.00
	TT-agua - APTdc-PCR	0.00
	MSR/V-agua - APTdc-PCR	0.17

¹ Técnicas Tetratonato (TT), Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSR/V), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APTdc-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSR/V-PCR) y caldo tetratonato (TT-PCR).

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

* Indica que el coeficiente es significativamente distinto de cero ($P < 0,05$).

2.2.3. Sección III. Detección de *Salmonella* en excreta de aves de corral.

Los recuentos de bacterias totales y Enterobacterias en las muestras de excreta tuvieron valores de $6,6 \times 10^7$ UFC/g y $1,8 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente. En relación a la capacidad discriminatoria de los métodos, la Esp fue 1 para todas las cepas en ambos métodos bacteriológicos ensayados. Se encontraron diferencias significativas de Se, Pre y VPN entre *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036 y los otros serotipos móviles (Tabla 2.21). La Se tuvo valores entre 0,75 a 1 para los métodos TT-excreta y MSR/V-excreta para las cepas de los serotipos móviles de *Salmonella*, mientras que para las cepas de *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036, el mismo parámetro osciló entre 0 y 0,63. Por otro lado, la Pre varió entre 0,80 a 1 y desde 0,11 a 0,67 para cepas móviles e inmóviles, respectivamente. Con referencia a los VPN, este parámetro tuvo

valores variables entre 0,50 a 1 para el método TT-excreta y entre 0,75 a 1 para el método MSRV-excreta para los serotipos móviles. Sin embargo, su valor fue menor a 0,25 para ambos métodos bacteriológicos cuando fue calculado para la cepa de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. El VPP fue 1 para la mayoría de los serotipos estudiados con excepción de la técnica TT-excreta para *S. Gallinarum* CUB 55/10 y MSRV-excreta para *S. Pullorum* ATCC 13036. En estas últimas cepas, el VPP no pudo calcularse (indeterminado = 0/0), debido a la ausencia de VP y FP (Tabla 2.21).

Con referencia a la técnica de PCR, en general, la Se y la Pre fueron más bajas en APT-PCR que en los otros métodos (TT-PCR y MSRV-PCR) en la mayoría de las cepas estudiadas (Tabla 2.22). La Esp fue 1 para todas las cepas, excepto para *S. Typhimurium* ATCC 13311 y *S. Enteritidis* ATCC 13036, ya que algunas muestras resultaron ser FP. Los VPn y VPP se muestran en la Tabla 2.23. El VPP fue 1 para la mayoría de las cepas e indeterminado para *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Pullorum* ATCC 13036. Todas las cepas mostraron VPn menores a 0,21 en APT-PCR. Por otro lado, las técnicas MSRV-PCR y TT-PCR tuvieron valores de VPn que oscilaron entre 0,25 a 1 para los serotipos móviles y entre 0,13 a 0,60 para *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036.

Al analizar los límites de detección de las técnicas bacteriológicas (Tabla 2.24) todas las cepas móviles de *Salmonella* se recuperaron en la menor concentración de UFC inoculada y aplicando todos los métodos de cultivo ($2-18 \times 10^0$ UFC/25g), excepto con la cepa de *S. Typhimurium* ATCC 13311 que tuvo más limitada la detección, utilizando la técnica de TT-excreta ($2,2 \times 10^2$ UFC/25g de excreta). *S. Pullorum* ATCC 13036 sólo pudo recuperarse a partir de una muy alta concentración ($8,4 \times 10^7$ UFC/25g de excreta) empleando la técnica de TT-excreta. En cambio, *S. Gallinarum* CUB 55/10 ya pudo aislarse desde $6,9 \times 10^2$ UFC/25 g mediante el método MSRV-excreta. Con relación a los métodos moleculares, APT-PCR solamente detectó *S. Orion* y *S. Coeln* desde $1,8 \times 10^4$ UFC/25 g y $4,6 \times 10^3$ UFC/25 g, respectivamente. Aplicando tanto las técnicas MSRV-PCR como TT-PCR se detectaron todas las cepas de los serotipos móviles desde las menores concentraciones de UFC que fueron inoculadas en la excreta. Por su parte, *S. Gallinarum* CUB 55/10 fue detectada desde $6,9 \times 10^5$, $6,9 \times 10^2$ y $6,9 \times 10^3$ UFC/25 g por las técnicas APT-PCR, MSRV-PCR y TT-PCR, respectivamente. La cepa *S. Pullorum* ATCC 13036 fue detectada desde 8×10^5 UFC/25 g y 8×10^7 UFC/25g en TT^{1°} y MSRV, respectivamente (Tabla 2.25).

Tabla 2.21. Sensibilidad, precisión, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de los métodos Tetrionato (TT-excreta), Rappaport Vassiliadis Semisólido modificado (MSRV-excreta) y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para cada serotipo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en excreta de aves contaminada artificialmente. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza de 95 % para cada parámetro indicado.

Cepas	Sensibilidad		Precisión		Valor predictivo negativo		Valor predictivo positivo	
	TT-excreta	MSRV-excreta	TT-excreta	MSRV-excreta	TT-excreta	MSRV-excreta	TT-excreta	MSRV-excreta
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	0,75 ^{1a} (0,43-0,93)	0,92 ^{1a} (0,68-0,99)	0,80 ^{1a} (0,46-0,91)	0,93 ^{1a} (0,74-0,99)	0,50 ^{1a} (0,01-0,81)	0,75 ^{1a} (0,28-0,94)	1,00 ^{1a} (0,69-0,99)	1,00 ^{1a} (0,73-0,99)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	0,83 ^{1a} (0,54-0,96)	1,00 ^{1a} (0,75-0,99)	0,87 ^{1a} (0,65-0,95)	1,00 ^{1a} (0,79-0,99)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	1,00 ^{1a} (0,79-0,99)	1,00 ^{1a} (0,71-0,99)	1,00 ^{1a} (0,75-0,99)
<i>S. Coeln</i> CUB 21/08	0,92 ^{1a} (0,73-0,99)	0,96 ^{1a} (0,79-0,99)	0,93 ^{1a} (0,76-0,97)	0,96 ^{1a} (0,81-0,99)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	0,75 ^{1a} (0,28-0,94)	1,00 ^{1a} (0,84-0,99)	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)
<i>S. Orion</i> CUB 28/08	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ^{2a} (0,67-0,99)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	0,04 ^{2a} (0,00-0,20)	0,00 ^{2a} (0,04-0,28)	0,15 ^{2a} (0,06-0,32)	0,11 ^{2a} (0,04-0,28)	0,12 ^{3a} (0,04-0,29)	0,11 ^{2a} (0,04-0,28)	1,00 ^{1a} (0,15-0,99)	IND*
<i>S. Gallinarum</i> CUB 55/10	0,00 ^{2a} (0,00-0,13)	0,63 ^{3b} (0,42-0,78)	0,11 ^{2a} (0,04-0,28)	0,67 ^{3b} (0,47-0,81)	0,11 ^{3a} (0,04-0,28)	0,25 ^{2a} (0,09-0,51)	IND*	1,00 ^{1a} (0,79-0,99)

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

^{1,2,3} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

*IND = indeterminado (0/0)

Tabla 2.22. Sensibilidad, precisión y especificidad para las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetrionato (TT-PCR) para cada cepa de *Salmonella* inoculada en muestras de excreta de aves. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %.

Cepas	Sensibilidad			Precisión			Especificidad		
	APT-PCR	MSRV-PCR	TT-PCR	APT-PCR	MSRV-PCR	TT-PCR	APT-PCR	MSRV-PCR	TT-PCR
<i>S. Typhimurium</i>	0,00 ^{1a}	0,83 ^{1b}	0,50 ^{1b}	0,20 ^{1a}	0,80 ^{1b}	0,53 ^{1b}	1,00 ^{1a}	0,67 ^{1a}	0,67 ^{1a}
ATCC 1331	(0,00-0,24)	(0,54-0,96)	(0,25-0,96)	(0,07-0,45)	(0,54-0,92)	(0,29-0,75)	(0,39-0,99)	(0,19-0,93)	(0,19-0,93)
<i>S. Enteritidis</i>	0,00 ^{1a}	1,00 ^{1b}	1,00 ^{2b}	0,20 ^{1a}	0,93 ^{1b}	0,93 ^{2b}	1,00 ^{1a}	0,67 ^{1a}	0,67 ^{1a}
ATCC 13076	(0,00-0,24)	(0,75-0,99)	(0,75-0,99)	(0,07-0,45)	(0,74-0,99)	(0,74-0,99)	(0,39-0,99)	(0,11-0,98)	(0,11-0,98)
<i>S. Coeln</i>	0,29 ^{2a}	0,92 ^{1b}	0,75 ^{1b}	0,37 ^{1,2a}	0,93 ^{1b}	0,78 ^{1b}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}
CUB 21/08	(0,21-0,55)	(0,73-0,97)	(0,54-0,87)	(0,21-0,55)	(0,76-0,97)	(0,59-0,89)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)
<i>S. Orion</i>	0,43 ^{2a}	1,00 ^{1b}	1,00 ^{2b}	0,50 ^{2a}	1,00 ^{1b}	1,00 ^{2b}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}
CUB 28/08	(0,24-0,61)	(0,84-0,99)	(0,86-0,99)	(0,30-0,66)	(0,86-0,99)	(0,87-0,99)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)
<i>S. Pullorum</i>	0,00 ^{1a}	0,29 ^{2b}	0,13 ^{3b}	0,11 ^{1a}	0,37 ^{2b}	0,22 ^{3ab}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}
ATCC 13036	(0,00-0,13)	(0,14-0,49)	(0,04-0,31)	(0,04-0,28)	(0,21-0,55)	(0,10-0,40)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)
<i>S. Gallinarum</i>	0,33 ^{2a}	0,92 ^{1b}	0,50 ^{3a}	0,41 ^{2a}	0,93 ^{1b}	0,56 ^{1a}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}	1,00 ^{1a}
CUB 55/10	(0,17-0,53)	(0,73-0,97)	(0,31-0,97)	(0,24-0,59)	(0,76-0,97)	(0,37-0,97)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)

^{a, b} Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente distintos para cada parámetro (P < 0,05).

^{1, 2, 3} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

Tabla 2.23. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetracionato (TT-PCR) para cada cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inoculada en muestras de excreta de aves. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95 %.

Cepas	VPP			VPN		
	APT-PCR	MSRV-PCR	TT-PCR	APT-PCR	MSRV-PCR	TT-PCR
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 1331	IND*	0,91 ^{1a} (0,61-0,97)	0,86 ^{1a} (0,47-0,96)	0,20 ^{1a} (0,07-0,45)	0,50 ^{1a} (0,14-0,85)	0,25 ^{1a} (0,07-0,60)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	IND*	0,92 ^{1a} (0,66-0,98)	0,92 ^{1a} (0,66-0,98)	0,20 ^{1a} (0,07-0,45)	1,00 ^{2,3b} (0,29-0,99)	1,00 ^{2b} (0,29-0,99)
<i>S. Coeln</i> CUB 21/08	1,00 ^{1a} (0,63-0,99)	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ^{1a} (0,82-0,89)	0,15 ^{1a} (0,05-0,36)	0,60 ^{1,3a} (0,22-0,88)	0,33 ^{1a} (0,22-0,88)
<i>S. Orion</i> CUB 28/08	1,00 ^{1a} (0,71-0,99)	1,00 ^{1a} (0,84-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	0,19 ^{1a} (0,06-0,99)	1,00 ^{3b} (0,67-0,99)	1,00 ^{2b} (0,67-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	IND*	1,00 ^{1a} (0,63-0,99)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,15 ^{1a} (0,05-0,36)	0,13 ^{1a} (0,04-0,31)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 55/10	1,00 ^{1a} (0,66-0,99)	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ^{1a} (0,75-0,99)	0,16 ^{1a} (0,05-0,37)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	0,20 ^{1a} (0,07-0,45)

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente distintos para cada parámetro (P < 0,05).

^{1,2,3} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

* IND: indeterminado (0/0).

Tabla 2.24. Resultados obtenidos al inocular distintos serotipos de *Salmonella* en excreta de aves y posterior detección mediante las técnicas Tetracionato (TT-excreta), Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-excreta), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetracionato (TT-PCR) Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	UFC/25g	Metodología de detección de <i>Salmonella</i> a partir de excretas de aves					
		N° de muestras positivas/ N° total de muestras					
		TT 1°	TT 2°	MSRV	APT- PCR	MSRV- PCR	TT- PCR
<i>S. Typhimurium</i> ATCC13311	0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2.2 x 10 ⁰	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3
	2.2 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3
	2.2 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3
	2.2 x 10 ⁴	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	0	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3
	5.0 x 10 ⁰	1/3	0/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	4.6 x10 ¹	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	4.6 x10 ²	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
<i>S. Orion</i> CUB 28/08	4.6 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	1.8 x 10 ¹	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	1.8 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	1.8 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	1.8 x 10 ⁴	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3
	1.8 x 10 ⁵	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3
	1.8 x 10 ⁶	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3
1.8 x 10 ⁷	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
<i>S. Coeln</i> CUB 21/08	1.8 x 10 ⁸	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	5.0 x 10 ⁰	3/3	3/3	3/3	0/3	2/3	1/3
	4.6 x 10 ¹	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3
	4.6 x 10 ²	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	4.6 x 10 ³	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3
	4.6 x 10 ⁴	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	2/3
	4.6 x 10 ⁵	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	1/3
4.6 x 10 ⁶	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	4.6 x 10 ⁷	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3
	0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	8.4 x 10 ⁰	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	8.4 x 10 ¹	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	8.4 x 10 ²	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	8.4 x 10 ³	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	8.4 x 10 ⁴	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	8.4 x 10 ⁵	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
8.4 x 10 ⁶	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	
<i>S. Gallinarum</i> CUB 51/10	8.4 x 10 ⁷	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	2/3
	0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6.9 x 10 ⁰	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6.9 x 10 ¹	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6.9 x 10 ²	0/3	0/3	1/3	0/3	3/3	0/3
	6.9 x 10 ³	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3	1/3
	6.9 x 10 ⁴	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3	3/3
	6.9 x 10 ⁵	0/3	0/3	3/3	2/3	3/3	3/3
6.9 x 10 ⁶	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3	2/3	
6.9 x 10 ⁷	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	

Tabla 2.25. Sensibilidad y precisión para los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales en los métodos tetratiónato (TT-excreta) y Rappaport-Vassiliadis Semisólido (MSRV-excreta) para las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inoculadas en excreta de aves ponedoras. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de siembra (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepas	Medio*	Sensibilidad			Precisión		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	XLD	0,75 ^{1a} (0,43-0,93)	0,50 ^{1a} (0,25-0,74)	0,92 ¹ (0,68-0,99)	0,80 ^{1a} (0,43-0,93)	0,60 ^{1a} (0,43-0,93)	0,93 ¹ (0,43-0,93)
	EF18	0,50 ^{1a} (0,25-0,24)	0,42 ^{1a} (0,19-0,68)	0,92 ¹ (0,68-0,99)	0,60 ^{1a} (0,35-0,80)	0,53 ^{1a} (0,29-0,75)	0,93 ¹ (0,74-0,99)
	XLDT ₄	0,42 ^{1a} (0,19-0,68)	0,33 ^{1a} (0,13-0,61)	0,92 ¹ (0,68-0,99)	0,53 ^{1a} (0,54-0,92)	0,47 ^{1a} (0,24-0,60)	0,93 ¹ (0,74-0,99)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	XLD	0,83 ^{1a} (0,54-0,96)	0,67 ^{1a} (0,38-0,86)	0,92 ¹ (0,68-0,99)	0,87 ^{1a} (0,65-0,95)	0,73 ^{1a} (0,46-0,91)	0,93 ¹ (0,74-0,99)
	EF18	0,75 ^{1a} (0,43-0,93)	0,67 ^{1a} (0,38-0,86)	0,92 ¹ (0,68-0,99)	0,80 ^{1a} (0,54-0,92)	0,73 ^{1a} (0,46-0,91)	0,93 ¹ (0,74-0,99)
	XLDT ₄	0,67 ^{1a} (0,38-0,86)	0,50 ^{1a} (0,25-0,74)	0,83 ¹ (0,54-0,96)	0,73 ^{1a} (0,46-0,91)	0,60 ^{1a} (0,5-0,80)	0,87 ¹ (0,65-0,95)
<i>S. Coeln</i> CUB 21/08	XLD	0,92 ^{1a} (0,73-0,97)	0,96 ^{1a} (0,79-0,99)	0,96 ¹ (0,79-0,99)	0,93 ^{1a} (0,76-0,97)	0,96 ^{1a} (0,81-0,99)	0,96 ¹ (0,81-0,99)
	EF18	0,83 ^{1a} (0,64-0,95)	0,88 ^{1a} (0,68-0,95)	0,92 ¹ (0,73-0,97)	0,88 ^{1a} (0,71-0,95)	0,88 ^{1a} (0,71-0,95)	0,92 ¹ (0,76-0,99)
	XLDT ₄	0,91 ^{1a} (0,71-0,97)	0,92 ^{1a} (0,73-0,97)	0,96 ¹ (0,79-0,99)	0,92 ^{1a} (0,67-0,93)	0,93 ^{1a} (0,76-0,97)	0,96 ¹ (0,81-0,99)
<i>S. Orion</i> CUB 28/08	XLD	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ¹ (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ¹ (0,87-0,99)
	EF18	0,96 ^{1a} (0,79-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ¹ (0,86-0,99)	0,96 ^{1a} (0,81-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ¹ (0,87-0,99)
	XLDT ₄	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ¹ (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ^{1a} (0,87-0,99)	1,00 ¹ (0,87-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	XLD	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ¹ (0,00-0,13)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ¹ (0,04-0,28)
	EF18	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ¹ (0,00-0,13)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ¹ (0,04-0,28)
	XLDT ₄	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ¹ (0,00-0,13)	0,15 ^{1a} (0,06-0,32)	0,15 ^{1a} (0,06-0,32)	0,15 ¹ (0,06-0,32)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 55/10	XLD	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,58 ¹ (0,38-0,75)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,63 ¹ (0,44-0,78)
	EF18	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,29 ² (0,14-0,75)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,37 ² (0,21-0,55)
	XLDT ₄	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,00 ^{1a} (0,00-0,13)	0,29 ² (0,14-0,49)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,37 ² (0,21-0,55)

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma fila para cada parámetro son significativamente distintos ($P < 0,05$).

^{1,2} Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

*XLD: agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄ = XLD con tergitol; EF-18 = agar EF-18.

Tabla 2.26. Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) para los medios de cultivo agarizados selectivos-diferenciales mediante las técnicas tetracionato (TT-excreta) y Rappaport-Vassiliadis Semisólido modificado (MSRV-excreta) para las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inoculadas en excreta de aves ponedoras. Para el método TT, se detallan los resultados para el primer y sexto día de incubación (TT1° y TT2°, respectivamente).

Cepa	Medio**	VPP			VPN		
		TT 1°	TT 2°	MSRV	TT 1°	TT 2°	MSRV
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	XLD	1,00 ^{1a} (0,89-0,99)	1,00 ^{1a} (0,89-0,99)	1,00 ¹ (0,91-0,99)	0,50 ^{1a} (0,43-0,93)	0,33 ^{1a} (0,43-0,93)	0,75 ¹ (0,43-0,93)
	EF18	1,00 ^{1a} (0,59-0,99)	1,00 ^{1a} (0,59-0,99)	1,00 ^{1a} (0,91-0,99)	0,33 ^{1a} (0,12-0,65)	0,30 ^{1a} (0,10-0,60)	0,75 ¹ (0,28-0,24)
	XLDT ₄	1,00 ^{1a} (0,54-0,99)	1,00 ^{1a} (0,54-0,99)	1,00 ^{1a} (0,91-0,99)	0,30 ^{1a} (0,10-0,60)	0,27 ^{1a} (0,09-0,57)	0,75 ¹ (0,28-0,94)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	XLD	1,00 ^{1a} (0,71-0,99)	1,00 ^{1a} (0,66-0,99)	1,00 ¹ (0,91-0,99)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	0,43 ^{1a} (0,09-0,53)	0,75 ¹ (0,11-0,98)
	EF18	1,00 ^{1a} (0,71-0,99)	1,00 ^{1a} (0,66-0,99)	1,00 ¹ (0,91-0,99)	0,50 ^{1a} (0,01-0,81)	0,43 ^{1a} (0,09-0,53)	0,75 ¹ (0,11-0,98)
	XLDT ₄	1,00 ^{1a} (0,66-0,99)	1,00 ^{1a} (0,59-0,99)	1,00 ¹ (0,71-0,99)	0,43 ^{1a} (0,09-0,53)	0,33 ^{1a} (0,12-0,65)	0,60 ¹ (0,22-0,88)
<i>S. Coelb</i> CUB 21/08	XLD	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ¹ (0,85-0,99)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	0,75 ^{1a} (0,28-0,94)	0,75 ¹ (0,28-0,94)
	EF18	1,00 ^{1a} (0,83-0,99)	1,00 ^{1a} (0,84-0,99)	1,00 ¹ (0,85-0,99)	0,50 ^{1a} (0,18-0,81)	0,50 ^{1a} (0,18-0,81)	0,60 ¹ (0,22-0,88)
	XLDT ₄	1,00 ^{1a} (0,83-0,99)	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ¹ (0,85-0,99)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	0,60 ^{1a} (0,22-0,88)	0,75 ¹ (0,28-0,88)
<i>S. Orion</i> CUB 28/08	XLD	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ¹ (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	1,00 ¹ (0,67-0,99)
	EF18	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ¹ (0,86-0,99)	0,75 ^{1a} (0,28-0,97)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	1,00 ¹ (0,67-0,99)
	XLDT ₄	1,00 ^{1a} (0,85-0,99)	1,00 ^{1a} (0,86-0,99)	1,00 ¹ (0,86-0,99)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	1,00 ^{1a} (0,67-0,99)	1,00 ¹ (0,67-0,99)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	XLD	IND *	IND *	IND *	0,11 ^{1a} (0,04-0,31)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ¹ (0,04-0,28)
	EF18	IND *	IND *	IND *	0,11 ^{1a} (0,04-0,31)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ¹ (0,04-0,28)
	XLDT ₄	1,00 (0,15-0,99)	IND *	IND *	0,12 ^{1a} (0,04-0,29)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ¹ (0,04-0,28)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 55/10	XLD	IND *	IND *	1,00 (0,78-0,99)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,23 ¹ (0,08-0,50)
	EF18	IND *	IND *	1,00 (0,63-0,99)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,15 ¹ (0,05-0,36)
	XLDT ₄	IND *	IND *	1,00 (0,63-0,99)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,11 ^{1a} (0,04-0,28)	0,15 ¹ (0,05-0,36)

^{a, b}Valores con letras diferentes en la misma fila para cada parámetro son significativamente distintos (P < 0,05).

^{1, 2}Valores con números diferentes en la misma columna son significativamente distintos (P < 0,05).

*IND= indeterminado (0/0)

**XLD: agar xilosa lisina desoxicolato; XLDT₄= XLD con tergitol; EF-18= agar EF-18

No se encontraron diferencias significativas de Se y Pre en todas las cepas de *Salmonella* que fueron cultivadas en los tres medios selectivos-diferenciales (Tabla 2.25). Se determinaron valores de Se y Pre superiores a 0,82 cuando se aplicó la técnica de MSRV-excreta en todas las cepas móviles que fueron examinadas. En cambio, estos mismos parámetros fueron menores a 0,59 para las cepas de *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036. Con relación a los dos tiempos de incubación del método TT-excreta (TT1° y TT2°), la Se y Pre fueron similares con valores que variaron entre 0,33 y 1 para las cepas móviles. Sin embargo, estos parámetros fueron menores a 0,16 para *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036.

La tabla 2.26, muestra los VPP y VPN para los medios agarizados selectivos-diferenciales. El VPP fue de 1 para cepas móviles. El agar XLT₄ en TT1° presentó un VPP de 1 para la cepa *S. Pullorum* ATCC 13036 e indeterminado para TT2° y MSRV-excreta en la misma cepa. En el caso de *S. Gallinarum* CUB 55/10, los tres medios agarizados tuvieron un VPP de 1 mediante la técnica MSRV-excreta. En cuanto al VPN varió entre 0,27 y 1 para las cepas móviles y fue menor de 0,24 para las cepas de *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036.

Tabla 2.27. Coeficientes Kappa mostrando grado de concordancia entre todos los métodos estudiados

Cepas de <i>Salmonella</i>	Comparación entre los métodos ¹	Coeficiente Kappa
Móviles	TT-excreta / MSRV-excreta	0.89*
	MSRV- PCR/APT-PCR	0.02*
	TT- PCR/APT-PCR	0.12*
	TT- PCR/MSRV- PCR	0.59*
Inmóviles	TT-excreta / MSRV-excreta	-0.03
	MSRV-PCR/APTPCR	0.23*
	TT-PCR/APT-PCR	0.52*
	TT-PCR/MSRV- PCR	0.47*

¹ Técnicas Tetrionato (TT-excreta), Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-excreta), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con templados obtenidos a partir de cultivos en agua de peptona tamponada (APT-PCR), medio Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV-PCR) y caldo tetrionato (TT-PCR).

* Indica que kappa es significativamente distinto de cero (P < 0,05).

El análisis mediante estadístico kappa demostró una muy buena concordancia entre los métodos bacteriológicos para las cepas móviles de *Salmonella*, mientras que la misma fue nula para las cepas de *S. Gallinarum* CUB55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036. (Tabla 2.27). Con relación a los métodos de PCR, la concordancia entre APT-PCR y MSRV-PCR /TT-PCR fue pobre para las cepas de los serotipos móviles y ligera a débil para las cepas de *S. Gallinarum* CUB55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036. Asimismo, la concordancia entre los métodos MSRV-PCR y TT-PCR fue débil para todas cepas estudiadas.

2. 3. Discusión

2.3.1. Sección I. Detección de *Salmonella* en alimento.

En el presente capítulo se estudió la capacidad discriminadora de dos métodos de cultivo y PCR para la recuperación de serotipos móviles de salmonelas paratíficas e inmóviles de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, en un alimento para aves que fue contaminado artificialmente. Cada cepa fue sometida a estrés por calor, antes de los aislamientos, a fin de simular las condiciones usuales que ocurren en la elaboración del alimento balanceado. Esto es importante, ya que el alimento para aves usualmente se expone a distintos tratamientos para disminuir la colonización bacteriana. Sherry *et al.* (2004) estudió la resistencia al calor de 40 serotipos de *Salmonella entérica* y concluyó que la capacidad de resistencia al calor es inherente a cada aislamiento de *Salmonella* sp.

El modo convencional de calcular la eficiencia de los tratamientos térmicos en los alimentos se basa en el supuesto de que las curvas de sobrevivencia/inactivación de las células microbianas responden a una cinética de primer orden. Esto significa que existe una relación lineal entre el logaritmo decimal del número de sobrevivientes y el tiempo de tratamiento a una determinada temperatura (Mafart *et al.*, 2002). De acuerdo a este enfoque, todas las células dentro de una población tienen la misma sensibilidad al calor, es decir que la población es homogénea en términos de su resistencia a la temperatura (Peleg y Cole, 1998; Mafart *et al.*, 2002). Al analizar los datos de sobrevivencia a 60 °C en las distintas cepas de *Salmonella* sp. utilizadas en el presente estudio, ninguno de ellos respondía a curvas lineales de inactivación, lo que concuerda con otros trabajos publicados (Mattick *et al.*, 2001; Peleg y Cole, 1998; van Boekel, 2002). El modelo propuesto por Mafart *et al.* (2002) considera que dentro de una población microbiana la resistencia al calor es variable de un organismo al otro. En este caso, la curva de inactivación expresa una distribución acumulativa de tiempos de inactivación individuales (van Boekel, 2002). En nuestro estudio, los parámetros de forma correspondientes a la ecuación $\log N/N_0 = -(t/\delta)^p$

resultaron todos < 1 , lo cual explica la concavidad hacia arriba de todas las curvas estudiadas. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Peleg y Cole (1998), en el cual la curva de inactivación de *S. Typhimurium* mostró concavidad hacia arriba. Biológicamente, un parámetro de forma < 1 significa que las células sobrevivientes tienen menor probabilidad de muerte, lo cual indica que son más fuertes o más resistentes al estrés por calor (van Boeckel, 2002). La comparación del parámetro δ respecto a otros trabajos resulta dificultosa debido a la diferencia en las matrices y temperaturas utilizadas en los distintos estudios. Van Boeckel (2002) reporta diferentes valores de δ para distintos serotipos de *Salmonella*. Este autor informa valores de δ de 0,09 a 0,1 en cepas de *S. Enteritidis* expuestas a 60°C para matrices como yema de huevo y leche, respectivamente. Estos resultados contrastan con los obtenidos en nuestro estudio, en el cual el tiempo de la primera reducción decimal para la cepa de *S. Enteritidis* PT1 fue de 0,89 a 60°C en BFS. Estas diferencias reflejan que la eficacia de la destrucción de los microorganismos por calor (u otros agentes letales) está afectada no sólo por la temperatura, sino también por las características de la matriz, como pH, actividad del agua, presencia de químicos etc. (Peleg y Cole, 1998). El serotipo *S. Kentucky* y las biovariedades *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* presentaron los valores de δ menores a 0,37 minutos. En lo que respecta a los estas biovariedades, estos resultados coinciden con los datos de EFSA (2011), según los cuales *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* son menos resistentes al calor. Según la misma fuente, estos serotipos pueden destruirse a 60°C durante 10 minutos, lo cual concuerda con los resultados de este estudio para la cepa de *S. Gallinarum* CUB 93/110, en la que se alcanzó la destrucción total de los microorganismos con esa temperatura de tratamiento. La variación entre los parámetros encontrados cobra importancia a nivel de los procesos térmicos que se realizan a los alimentos de las aves de corral, como por ejemplo el peletizado, en el cual la temperatura y el tiempo de tratamiento son claves para la destrucción o reducción de *Salmonella* sp. y otros patógenos.

Todas las cepas móviles de salmonelas paratíficas expuestas a 60°C pudieron recuperarse mediante las técnicas utilizadas. Por otro lado, las cepas inmóviles de las biovariedades *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* mostraron diferentes valores de daño celular (desde 52 a 90 %) e inclusive presentaron variaciones dentro de la misma biovariedad. Además, se dificultó su aislamiento a partir de las muestras de alimento con las técnicas bacteriológicas. Por otro lado, la detección de dichas biovariedades fue mayor mediante PCR, resultando por este método positivas muchas de las muestras que no pudieron confirmarse mediante aislamiento.

Andrews (1986) 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. Wilson y Davies (1976) mostraron que células sometidas a daño por calor durante su fase estacionaria fueron menos resistentes que las células en fase exponencial de crecimiento. Durante el presente estudio, las muestras inoculadas fueron pre-enriquecidas en CTS-Fe. Algunos medios de cultivo de pre-enriquecimiento recomendados para el aislamiento de *Salmonella* incluyen agua de peptona tamponada (APT) y CTS (Gast, 2003). 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* en huevo crudo. No se registró en la bibliografía la utilización del CTS-Fe para el aislamiento de *Salmonella* en alimento balanceado para aves. Sin embargo, 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).

Debido a que los niveles de *Salmonella* potencialmente presentes en alimento son bajos, se inocularon bajas concentraciones de esta bacteria en el alimento. La Pre y Se calculadas fueron más bajas en las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* que en las cepas paratíficas móviles. Todas las cepas pudieron recuperarse por medio del CTS-Fe, siendo la mayoría detectada en altas concentraciones (10^4 - 10^6 UFC/25g) tanto por el método de MSRV-alimento como por el TT-alimento, a pesar que la mayoría de estas cepas mostraron daño celular menor o igual al 90%, según se determinó en agar MC.

Aunque la bibliografía indica que las cepas inmóviles de *Salmonella* representan menos del 1 % de los aislamientos efectuados a partir de alimento balanceado para consumo animal (Poppe *et al.*, 2004), los diferentes trabajos publicados indican solamente el aislamiento de cepas móviles (Cox *et al.*, 1983; De Franceschi *et al.*, 1989; del Pozo Saenz *et al.*, 2001; Williams, 1981). Los VPN para las cepas inmóviles de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* fueron muy bajos para los métodos bacteriológicos empleados en nuestros ensayos. Esto refleja la posibilidad de que las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* pudiesen ser menos competitivas frente a la microflora presente en la muestra.

Kuijpers *et al.* (2010) reportaron que el número de aislamientos positivos depende más de la elección del medio de enriquecimiento que de la elección de los medios selectivos

agarizados. Van Schothorst *et al.* (1977) mostraron que el desarrollo de microorganismos competidores de las salmonelas en caldo TT puede disminuir el efecto inhibitorio del medio para el aislamiento de *Salmonella*. Waltman *et al.* (1993) indicaron que es posible mejorar la recuperación de salmonelas a partir de muestras ambientales y de diagnóstico, manteniendo las muestras en el caldo de enriquecimiento durante un tiempo adicional de 5 días a temperatura ambiente. Este lapso de tiempo permite alcanzar una concentración detectable de *Salmonella* sp. Además otros autores publicaron que, con un período de incubación de 48 h, se obtuvo mayor número de muestras positivas a *Salmonella* en los medios de enriquecimiento (Edel y Kampelmacher, 1974; Kuijpers *et al.*, 2008). En el presente estudio, las muestras de alimento se incubaron a 35°C durante 6 días (método TT-alimento), sin incubación a temperatura ambiente, resultando mejor el aislamiento con TT1° que TT2°. Para las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, solamente se recuperaron a partir de altas concentraciones en TT1°. Por lo tanto, un día de incubación fue suficiente para el aislamiento de *Salmonella* sp. Por otro lado, se sabe que el medio MSRV-alimento no es indicado para el aislamiento de cepas inmóviles de *Salmonella* (Poppe *et al.*, 2004). A pesar de ello, dos cepas de *S. Gallinarum* pudieron recuperarse con el método MSRV-alimento aunque sólo a partir de altas concentraciones iniciales (10^5 UFC/25g).

El tipo de muestra y, en especial, la composición de la flora acompañante, es de suma importancia en la eficiencia de un medio agarizado selectivo. El crecimiento de bacterias distintas a *Salmonella* sp. puede interferir la lectura de las placas, ya que las colonias de *Salmonella* 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 FN, aunque este procedimiento implica un costo extra. En este estudio, se emplearon 4 medios agarizados selectivos-diferenciales. Aunque no se registraron diferencias significativas entre ellos, los medios MC y VB mostraron un número mayor de FN que las placas de XLDT y EF18 en los dos métodos bacteriológicos que fueron empleados.

Es difícil la comparación de resultados entre estudios de PCR por la falta de protocolos estandarizados con relación al procesamiento de las muestras y la variedad de reactivos y equipamientos utilizados (Mynt *et al.*, 2006). Löfström *et al.* (2004) demostraron que varios alimentos destinados al consumo animal fueron altamente inhibidores para las muestras de PCR que habían sido preenriquecidas en APT. Estos autores concluyeron que debe considerarse la composición biológica de la muestra y que la misma debe ser analizada al optimizar un protocolo de PCR. Además, los límites de detección encontrados por aquellos autores fueron más altos que el reportado en este estudio. Bansal *et al.* (2006)

investigaron la aplicación de un ensayo de PCR para ser utilizado después del desarrollo de las salmonelas en un medio de enriquecimiento, técnica que fue adecuada para el monitoreo de alimentos naturalmente contaminados con *Salmonella*; estos autores encontraron una perfecta concordancia entre PCR y métodos de cultivo estándares. Nuestro estudio mostró resultados similares en términos de concordancia entre los métodos bacteriológicos y de PCR, aunque solamente para las cepas móviles. Koyunku *et al.* (2010) también obtuvieron resultados similares para los serotipos móviles. Sin embargo, en nuestro estudio, las cepas inmóviles tuvieron mejor detección mediante PCR que con los métodos TT y MSRV. De cualquier manera, los métodos basados en PCR no pueden reemplazar a los métodos bacteriológicos, sobre todo en investigaciones epidemiológicas o estudios de seguimiento en los cuales es necesario disponer del microorganismo.

2.3.2. Sección I. Detección de *Salmonella* en agua de bebida de aves de corral.

Poppe *et al.* (1991) estimaron la prevalencia de *Salmonella* Enteritidis y otros serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* en granjas de pollos parrilleros usando diferentes tipos de muestras, incluidas muestras de agua de bebida. Para ello estos autores utilizaron MSRV como medio de enriquecimiento selectivo y de un total de 875 muestras examinadas detectaron 12,3% como positivas a *Salmonella*. Los serotipos aislados por estos autores fueron: *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Senftberg*, *S. Enteritidis* y *S. Kentucky*. Los resultados de la presente Tesis demostraron que los métodos empleados tienen una excelente recuperación para *S. Enteritidis* y *S. Kentucky*, particularmente usando MSRV-agua, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Poppe *et al.* (1991). Además, para el resto de los serotipos móviles estudiados en este trabajo, la capacidad discriminadora de los métodos también fue alta. Por otro lado, Moriñigo *et al.* (1993) compararon medios selectivos de enriquecimiento para la detección de *Salmonella* a partir de muestras de agua y sugirieron que el caldo tetratonato era inhibitorio para los microorganismos de este género. Cabe señalar estos autores utilizaron una temperatura de incubación de 43°C y como se ha demostrado el caldo tetratonato aumenta sensiblemente el grado de inhibición cuando es incubado a partir de los 42°C (Hammack *et al.*, 1999). En nuestro estudio, la temperatura de incubación del medio tetratonato fue de 35°C \pm 2 y, utilizando caldo tetratonato a esta temperatura, se obtuvieron valores altos de Se y Pre en todas las cepas móviles que fueron examinadas.

En las muestras de agua que fueron examinadas en esta Tesis, las técnicas bacteriológicas utilizadas mostraron valores bajos de capacidad discriminadora para los serotipos de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. A pesar que el medio MSRV no se recomienda

para el aislamiento de cepas inmóviles de *Salmonella* sp. (Poppe *et al.*, 2004), en este estudio se pudo recuperar a *S. Gallinarum* CUB 55/10 empleando el método MSR-V-agua, a pesar que los valores de Se y Pre fueron diferentes de los obtenidos cuando se evaluaron las cepas móviles. Estos resultados indican que el muestreo de agua puede subestimar la presencia de *S. Gallinarum* o *S. Pullorum*. Por otro lado, los bajos valores en los parámetros de los métodos TT-agua y MSR-V-agua en las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* también fueron reflejados en los medios agarizados selectivos-diferenciales. Esto señala la posibilidad de que las cepas inmóviles pudiesen ser menos competitivas frente a la microflora presente en la muestra.

La técnica de PCR ofrece un método rápido y confiable para la detección de *Salmonella* y ha sido usada exitosamente para el diagnóstico de la presencia de bacterias patógenas en muestras ambientales de agua, clínicas y de alimento (Mogamedi *et al.*, 2007). Por otro lado, un control interno de amplificación (CIA) es necesario para prevenir resultados FN que puedan originarse por inhibición de la PCR. Mogamedi *et al.* (2007) obtuvieron un límite de detección de 26 UFC/ml para una dilución de *S. Enteritidis* ATCC 13076. En este trabajo, se utilizó un CIA para cada ensayo de PCR y obtuvimos resultados similares para la misma cepa y para las otras cepas móviles que se examinaron. Con referencia a las cepas de *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036, los límites de detección en la PCR fueron similares a los ya informados para ambas biovariedades en estudios previos realizados sobre otras matrices (Oliveira *et al.*, 2002).

2.3.3. Sección III. Detección de *Salmonella* en excretas de aves de corral.

Voogt *et al.* (2001) procesaron 1.022 muestras de materia fecal procedentes de una granja de gallinas ponedoras. Estos autores encontraron que el 92 % de las muestras fueron positivas a *Salmonella* usando el agar MSR-V, de manera similar a lo encontrado por Eriksson y Aspan (2007). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio de Tesis en cuanto a los altos valores de Se y Pre para los serotipos móviles ensayados en excretas.

Al analizar los parámetros de capacidad discriminadora de los métodos entre las cepas de los serotipos móviles y los inmóviles de *S. Gallinarum* CUB 55/10 y *S. Pullorum* ATCC 13036 se encontraron diferencias significativas. El anexo D de la norma ISO 2002 indica que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* no parecen tener la capacidad de sobrevivir por tiempos prolongados en muestras ambientales y por lo tanto son raramente detectadas en muestras de excreta, independientemente del método que se utilice. En el mismo anexo D y Poppe *et al.* (2004) se indica que el medio MSR-V es inadecuado para el aislamiento de

cepas de *Salmonella* sp. inmóviles. Sin embargo, cabe señalar que en el presente estudio se pudo recuperar *S. Gallinarum* utilizando el método MSR/V a partir de concentraciones de $6,9 \times 10^2$ UFC/25 g de muestras fecales.

Berchieri *et al.* (1995) señalaron que, a diferencia de otras salmonelas, las biovariedades *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* no son intensamente excretadas a través de las heces. De hecho, Berchieri *et al.* (2000) demostraron que la excreción depende de la susceptibilidad del lote a la infección por *Salmonella*. Por otro lado, Proux *et al.* (2002) indicaron que si el control de *Salmonella* se basa exclusivamente en el análisis bacteriológico de excretas e hisopados cloacales, es difícil detectar a *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*; estos autores sólo pudieron aislar a estas bacterias mediante cultivos que fueron efectuados a partir del hígado y bazo de pollitos infectados, mientras que las excretas y los hisopados cloacales fueron todos negativos en los cultivos efectuados en ese mismo lote de aves.

Se sabe que las excretas contienen gran cantidad de componentes metabólicos (fenoles, polisacáridos) que son inhibidores de la PCR. Además, para detectar bajos niveles de *Salmonella* por métodos de PCR se requiere efectuar un previo paso de enriquecimiento para lograr la multiplicación de las bacterias antes de realizar el ensayo de PCR (Malorny y Hoofar, 2005). En nuestro estudio, para evitar la inhibición de la PCR, seguimos el protocolo descrito por Perez *et al.* (2008). Además se compararon los métodos de PCR efectuados a partir de los cultivos de pre-enriquecimiento (APT-PCR) y enriquecimiento selectivo (MSR/V-PCR y TT-PCR). Los métodos MSR/V-PCR y TT-PCR mostraron altos valores de Se y Pre. Carli *et al.* (2001) indicaron que el caldo TT no fue inhibitorio para los ensayos de PCR, lo que concuerda con los resultados de esta Tesis. Por otro lado, Eriksson y Aspan (2007) demostraron que aplicando una combinación de MSR/V seguida por PCR se obtuvo cerca del 100 % de Pre, Se y Esp. En este estudio, se obtuvieron resultados similares para la mayoría de las cepas. En este sentido, es importante resaltar que la incubación en un medio de enriquecimiento aumenta el número de microorganismos viables en la muestra y facilita la posterior detección por PCR (Carli *et al.*, 2001).

2.4. Conclusiones

- ✓ Los métodos de cultivo utilizados en alimento (TT-alimento, MSR/V-alimento), agua (MSR/V-agua, TT-agua) y excretas (TT-excreta, MSR/V-excreta) y PCR son similares en términos de Pre, Se, Esp, VPP y VPN para cepas móviles de *Salmonella* sp. en estas matrices para aves.
- ✓ El método TT-alimento es mejor o igual que el método MSR/V-alimento en términos de los parámetros estudiados para aislar cepas de *S. Gallinarum* y *S.*

Pullorum. Por su parte el método de PCR mejora los parámetros de capacidad discriminatoria en esta matriz para las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

- ✓ Las técnicas bacteriológicas y la PCR son similares en cuanto a su capacidad discriminatoria para la detección de serotipos móviles de *Salmonella* en muestras de agua.
- ✓ Para las cepas inmóviles de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, el uso de PCR y el método MSR/V puede mejorar el límite de detección.
- ✓ Los métodos aplicados en esta Tesis para muestras de agua de bebida se presentan como una alternativa para el procesamiento de estas muestras, sobre todo teniendo en cuenta la ausencia de protocolos estandarizados para ese tipo de matriz
- ✓ Aunque el MSR/V es un medio de cultivo que sólo se considera adecuado para el aislamiento de cepas móviles de *Salmonella*, este estudio demuestra que este medio también puede ser utilizado para detectar *Salmonella Gallinarum* a partir de excretas y agua de gallinas ponedoras, resultando mejor que el método TT-excreta. Para ello se requiere siempre subcultivar el MSR/V, aún en aquellos casos en los que no se observe halo de crecimiento.
- ✓ El uso de un paso de enriquecimiento selectivo, previo a la PCR, mejora los parámetros de capacidad discriminatoria de esta prueba molecular en las muestras de excreta usadas en este estudio.
- ✓ La dificultad para detectar los serotipos inmóviles de *Salmonella* sp., cuando se aplican *sensu strictu* las actuales técnicas estandarizadas, representa un potencial problema cuando una muestra de alimento balanceado, agua de bebida o excretas se diagnostica como negativa a las bacterias de este género.

Capítulo 3

Prevalencia de *Salmonella* spp. en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

Las enfermedades causadas por *Salmonella* sp. en seres humanos usualmente están asociadas al consumo de huevos contaminados. Por lo tanto, es necesario conocer la prevalencia actual de *Salmonella enterica* en las gallinas ponedoras y los factores que influyen la presencia y persistencia del patógeno en el ambiente de la granja (Van Hoorebecke *et al.*, 2010). Por otro lado, si bien la tifosis aviar causada por la biovariedad Gallinarum ha sido controlada en América del Norte y en el oeste de Europa, continúa siendo un problema importante en lugares con industrias avícolas en desarrollo, incluyendo Asia y Latinoamérica (Chappell *et al.*, 2009).

Un amplio estudio de la Unión Europea reveló que el 30,8% de 5.007 establecimientos de gallinas ponedoras fueron positivos a *Salmonella* sp. En el 20,4 % de los casos los aislamientos correspondieron al serotipo *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* (EFSA, 2006). En los Estados Unidos, se estimó que sólo un 0,005% de los huevos están contaminados con *S. Enteritidis*. En general, la producción de huevos contaminados con *S. Enteritidis* en un lote infectado es esporádica y la incidencia varía entre 0,3 al 0,56 % (Holt *et al.*, 2011).

En nuestro país, la provincia de Entre Ríos concentra el 41% de las granjas avícolas del país. El 22,7 % de estos establecimientos corresponden a explotaciones de gallinas ponedoras (Lamelas *et al.*, 2011) ubicadas en su mayor parte en la costa del río Paraná. Según un reciente estudio (Soria, 2012), la prevalencia de *Salmonella* sp. en huevos comercializados en supermercados del centro-este de la provincia de Entre Ríos fue del 1,8% (29/1.643 muestras). Sin embargo, no existen datos en esta provincia sobre la prevalencia a nivel de granjas en las que se desarrolla este tipo de producción.

Es crucial que las muestras utilizadas para la detección de *Salmonella* Enteritidis y otros serotipos de salmonelas provean un indicio claro del nivel de infección de la granja. Las muestras ambientales tienden a detectar más rápidamente la presencia del patógeno en el lote. Sin embargo, se debe tener en cuenta que una muestra ambiental positiva a salmonelas no informa acerca de la infección, sino solamente sobre la presencia del microorganismo (Holt *et al.*, 2011). Por otro lado, Van Hoorebecke (2010) sugiere que el cultivo de muestras de órganos (ovarios, oviductos o ciegos) es la forma más precisa para detectar la infección de un lote con bajos niveles de prevalencia de salmonelas, aun cuando este método sea más laborioso e implique un costo extra.

Por todo lo anterior, y en vista de la ausencia de datos previos, el objetivo del presente capítulo es evaluar la prevalencia de *Salmonella* sp. en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Criterios para la selección de las granjas.

La provincia de Entre Ríos se seleccionó para este trabajo debido a su importancia para la producción nacional de huevos. Para la elección de las granjas muestreadas se tuvo en cuenta el relevamiento de granjas avícolas (2006-2007) que fue realizado por el SENASA, mediante un convenio con las cámaras avícolas (CEPA y CAPIA). Según este relevamiento, la provincia de Entre Ríos cuenta con 265 granjas de producción de huevos, clasificadas, por su nivel de bioseguridad, en categorías A, B y C (Borgna, comunicación personal). La categoría A comprende a las granjas con la mejor bioseguridad y las incluidas en la categoría C son las que tienen la peor bioseguridad, estando la mayoría de las granjas encuadradas dentro de la categoría de bioseguridad media, es decir, categoría B (DGPA, 2007; Espinosa, 2007). Teniendo en cuenta esta categorización y la distribución de las granjas por departamento se realizó el cálculo para determinar el número de granjas a muestrear.

3.1.2. Tamaño de muestra

Basados en el número total de granjas de gallinas de postura en la provincia de Entre Ríos, se estimó el número de muestras según Mateu y Casal (2003) de acuerdo a la ecuación:

$n = Z^2 p q / B^2$, donde:

n = tamaño de la muestra

$Z = 1,64$ para el 90% de confianza

p = frecuencia esperada de la enfermedad

$q = 1 - p$

B = precisión o error admitido

Aplicando la fórmula correctora para poblaciones pequeñas

$1/n' = 1/n + 1/N$, donde:

n' = tamaño de la muestra necesario

n = tamaño de la muestra según la ecuación anterior

N = tamaño de la población

Al carecer de datos previos, se definió una prevalencia esperada del 50%, y un error del 14 % con un nivel de confianza del 90%. Aplicando estas ecuaciones, el tamaño muestral (n) calculado fue de 30 granjas. Este número permite afirmar que si la prevalencia es realmente del 50%, en el 90% de los casos la misma oscilará entre un 36 y un 64%.

Por lo tanto, se realizó un muestreo aleatorio estratificado en el cual se tomaron muestras de un total de 30 granjas de la provincia de Entre Ríos, distribuidas en los departamentos de Colón, Gualeguay, Uruguay, Nogoyá, Paraná, y Diamante. La Tabla 3.1 indica el número de granjas muestreadas por departamento y categoría de bioseguridad.

Tabla 3.1. Número total de granjas de gallinas de postura en la provincia de Entre Ríos según categorización por nivel de bioseguridad de SENASA (A, B ó C) y número de granjas muestreadas por departamento.

Departamento	Nº total de granjas en la provincia	Nivel de bioseguridad	Número de granjas totales por nivel de bioseguridad	Número de granjas a muestrear en base a número total de granjas	Número de granjas muestreadas
Colón	26	A	0	3	-
		B	19		5
		C	5		-
Diamante	34	A	1	4	-
		B	32		4
		C	1		-
Gualeguay	2	A	0	0	-
		B	2		1
		C	0		-
Gualeguaychú	12	A	1	1	-
		B	8		-
		C	3		-
Nogoyá	24	A	4	3	-
		B	12		2
		C	8		-
Paraná	152	A	3	17	2
		B	128		10
		C	15		1
		sin datos	6		1
Tala	2	A	2	0	-
		B	0		-
		C	0		-
Uruguay	13	A	1	2	-
		B	10		3
		C	2		1
Total	265		265	30	30

3.1.3 Criterio del muestreo

Se consideró galpón “automatizado” a aquel que cuenta con cintas transportadoras de guano, tolvas móviles y sistema automático de recolección de los huevos. Por el contrario, los galpones “convencionales” no poseen esta infraestructura y esas actividades se realizan manualmente.

Del total de 30 granjas, en aquellos establecimientos con más de 4 galpones se muestrearon dos de ellos. En los casos de granjas con galpones convencionales y automatizados se seleccionó un galpón de cada tipo. Si el establecimiento tenía un número menor o igual a 4 galpones, se muestreó uno solo de ellos. Por ello, en total se muestrearon 40 galpones.

Con fines prácticos y operativos, previo al muestreo se consideraron espacialmente las zonas del interior del galpón con los siguientes nombres (Figura 3.1):

- ✓ Hilera de jaulas: cada una de las líneas formadas por una o dos filas de jaulas
- ✓ Fila de jaulas: cada una de las líneas de jaulas que se disponen a lo largo del galpón.
- ✓ Pasillo central: espacio ubicado entre las hileras de jaulas más internas del galpón.
- ✓ Pasillos laterales: espacios ubicados entre el límite lateral del galpón y las filas de jaulas más externas del galpón.

El muestreo se realizó durante 8 meses, desde el 15 de agosto de 2011 hasta el 9 de abril de 2012. Las muestras se tomaron preferentemente en los lotes de mayor edad. Todas las aves muestreadas se encontraban en etapa de postura, excepto un lote en el cual la edad fue de 4 meses. Sin contar este último lote, la edad promedio de las aves muestreadas fue de 18 meses, con un mínimo de 6 meses y un máximo de 24 meses. El tamaño de los lotes seleccionados varió entre 450 y 30.500 animales (Tabla 3.2).

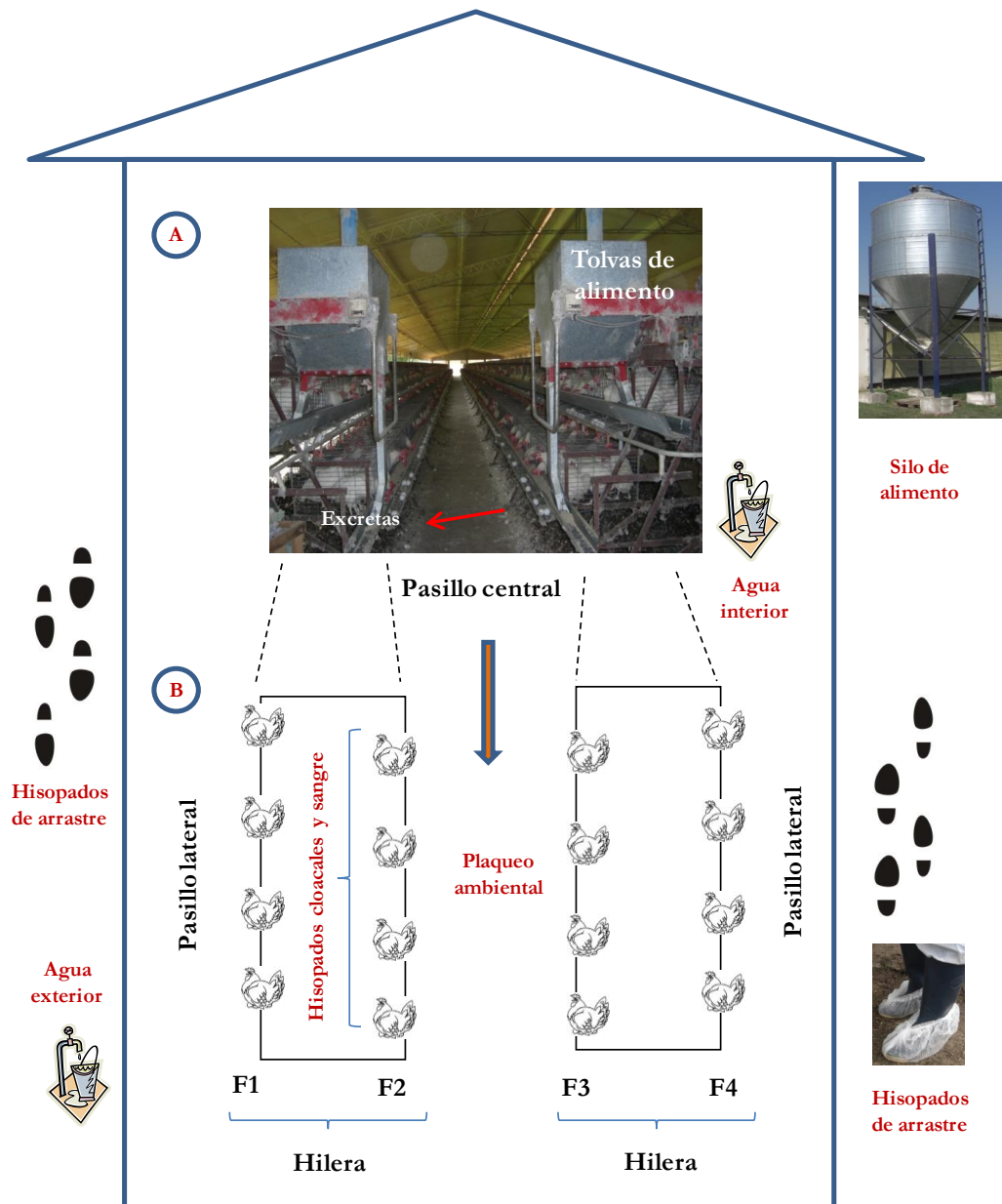


Figura 3.1. Esquema de un galpón y lugares de toma de muestra. A: vista frontal; B: vista superior. F1, F2, F3 y F4: filas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3.2. Número total, ubicación y características de los galpones muestreados.

N° Granja	Departamento (Localidad)	N° de galpones muestreados	Tipo de galpón	N° de aves	Edad (meses)
1	Colón (San José)	1	convencional	5.500	20
2	Colón (Colonia Nueva Norte)	1	convencional	11.500	24
3	Paraná (Crespo)	2	convencional	5.000	4
			automatizado	30.000	12
4	Paraná (Crespo)	1	convencional	4.032	18
5	Colón (San José)	2	convencional	8.800	18
			convencional	8.880	18
6	Uruguay (Herrera)	1	convencional	11.000	12
7	Uruguay (San Cipriano)	1	convencional	4.500	sin dato
8	Uruguay (San Cipriano)	1	convencional	450	36
9	Uruguay (San Cipriano)	1	convencional	3.000	30
10	Diamante (Aldea Protestante)	2	convencional	10.000	24
			convencional	10.000	20
11	Diamante (Aldea Protestante)	2	convencional	10.000	12
			convencional	3.281	5,5
12	Colón (San José)	1	convencional	3.900	12
13	Colón (San José)	2	convencional	4.704	7
			convencional	4.656	7
14	Diamante	1	automatizado	30.000	18
15	Diamante	1	convencional	6.000	7
16	Nogoyá	2	automatizado	30.500	12
			convencional	9.500	15
17	Paraná (Crespo)	2	convencional	10.000	sin dato
			automatizado	30.000	sin dato
18	Paraná (Crespo)	1	convencional	7.200	7
19	Paraná (Crespo)	1	convencional	7.600	24
20	Paraná (Crespo)	2	convencional	9.000	18
			automatizado	22.000	8
21	Paraná (Seguí)	1	convencional	6.000	23
22	Nogoyá (Algarobitos)	1	convencional	8.500	24
23	Paraná (Espinillo)	1	convencional	4.500	24
24	Paraná (Crespo)	2	automatizado	24.000	20
			convencional	6.000	24
25	Diamante	1	convencional	6.000	18
26	Gualeduay	1	convencional	11.500	12
27	Paraná (Crespo)	1	convencional	5.000	16
28	Paraná (Aldea María Luisa)	2	convencional	4.000	24
			automatizado	30.000	7
29	Paraná	1	convencional	4.500	24
30	Paraná (Espinillo)	1	convencional	5.137	21
Total		40			

3.1.4. Tipos de muestras

- a. Alimento. Para los galpones convencionales 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 (Figura 3.1). En el caso de los galpones automatizados, las muestras se tomaron desde los comederos. En todos los casos, se recolectaron 3 ± 1 kg de alimento en bolsas plásticas. Para ello se utilizó una pala o cuchara de plástico, previamente desinfectada con alcohol.
- b. Huevos. De cada galpón se recolectaron dos maples de treinta huevos cada uno, solicitando al propietario de la granja o encargado, la selección de los huevos más sucios.
- c. Excretas. En las granjas con galpones convencionales las excretas se recolectaron con cucharas plásticas estériles de unos 20 a 30 puntos diferentes, situados debajo del foso de las jaulas. En las granjas con galpones automatizados las excretas se muestrearon desde las cintas transportadoras, previo funcionamiento del sistema de alimentación automático. La muestra por hilera tenía un peso entre 300 ± 50 g.
- d. Hisopados cloacales. Las aves fueron seleccionadas al azar. En los galpones convencionales se hisoparon individualmente 5 aves por fila, obteniéndose 10 hisopos por cada hilera de jaulas. En las granjas con galpones automatizados, se tomaron 10 hisopados por cada fila. Para la toma de cada muestra, se utilizaron hisopos estériles previamente humedecidos en solución fisiológica estéril (NaCl 0,85%). 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 tubos de vidrio estériles agrupándolas a razón de 5 hisopados por tubo y se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio.
- e. Aves muertas. Se recolectaron entre 1 a 13 gallinas muertas que se encontraron en cada galpón muestreado durante el día de muestreo. Las aves se colocaron en bolsas plásticas para ser transportadas hasta el laboratorio.
- f. Agua. En cada granja se recolectó 1 litro de agua del tanque principal externo y/o otro litro de agua tomado desde las canillas ubicadas dentro del galpón (agua exterior e interior, respectivamente, Figura 3.1). Antes de tomar la muestra, se esterilizó el grifo flameando el extremo del mismo, mediante la llama obtenida con un hisopo de algodón empapado con alcohol. Luego se dejó correr el agua durante 3 a 5 minutos antes de proceder a recolectar la muestra.

g. Análisis microbiológico de la contaminación del aire. Se utilizó una técnica no volumétrica para el muestreo de aire del galpón. Para ello se emplearon placas plásticas de Petri de 9 cm de diámetro con agar MC. A lo largo de los pasillos centrales de cada galpón se ubicaron banquetas plásticas equidistantes entre sí, cuya distancia de separación varió según el largo de cada galpón. Para los galpones con un solo pasillo interno, se colocaron a lo largo del mismo entre 6 a 10 placas conteniendo agar MC. En aquellas granjas con dos o tres pasillos centrales, se ubicaron 5 placas por cada pasillo examinado. De esta manera, se colocaron entre 5 y 15 placas por galpón, distribuidas individualmente sobre las banquetas (Figura 3.2). Las tapas de las placas fueron retiradas y el agar MC fue expuesto al aire del galpón durante 10 minutos.

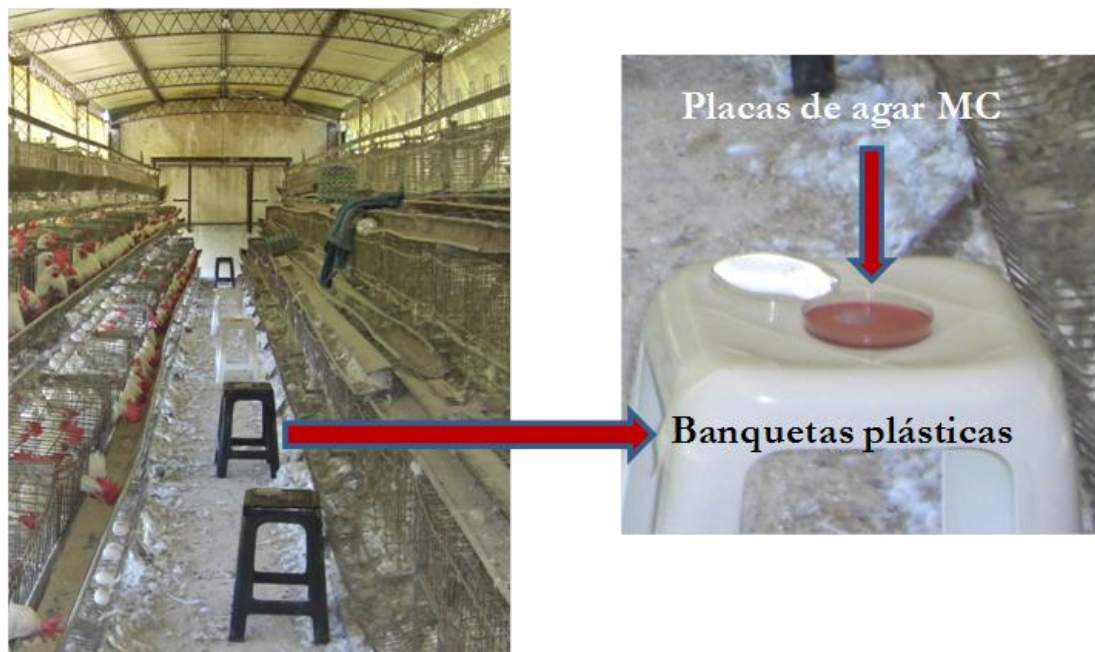


Figura 3.2. Muestreo ambiental con placas de agar MacConkey (MC).

- h. Hisopados de arrastre alrededor del galpón. Para tomar estas muestras se utilizaron cofias estériles. Antes de ser utilizadas se embebieron con solución fisiológica estéril (0,85% p/v). Luego, se colocaron las cofias sobre las botas de goma, previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70%. El perímetro de cada galpón se recorrió hasta la mitad utilizando un par de cofias. Para recorrer la mitad del perímetro restante, se utilizó un nuevo par de cofias. Ambos pares se introdujeron juntos en una bolsa plástica estéril (Figura 3.3).
- i. Sangre. Se seleccionó una sola fila por cada hilera de jaulas del galpón (la misma tomada para el hisopado cloacal de las aves). Las gallinas seleccionadas fueron sacadas

de las jaulas e inmovilizadas mediante sujeción manual de las patas y alas. Se extendió un ala y, luego de retirar las plumas a lo largo del recorrido de la vena alar, se realizó la antisepsia de la zona con un algodón embebido en alcohol etílico al 96%. Seguidamente, se realizó la inserción en la vena con una aguja hipodérmica estéril de pared fina y bisel trifasetado de 0,50x15mm (BD, PrecisionGlide™, Curitiba, Brasil) y jeringa hipodérmica estéril de 5 ml (Productos Médicos Descartables, S.A., Buenos Aires, Argentina). Se extrajo sangre a 5 aves por fila en los galpones convencionales y a 10 aves en los automatizados. Por cada gallina, se tomaron aproximadamente unos 2 ml de sangre que se fraccionó en 2 microtubos de plásticos (de 1,5 ml cada uno).

Todas las muestras fueron transportadas en una conservadora con refrigerantes congelados (hisopados cloacales y excretas) ó a temperatura ambiente (resto de muestras), llegando al laboratorio el mismo día del muestreo.

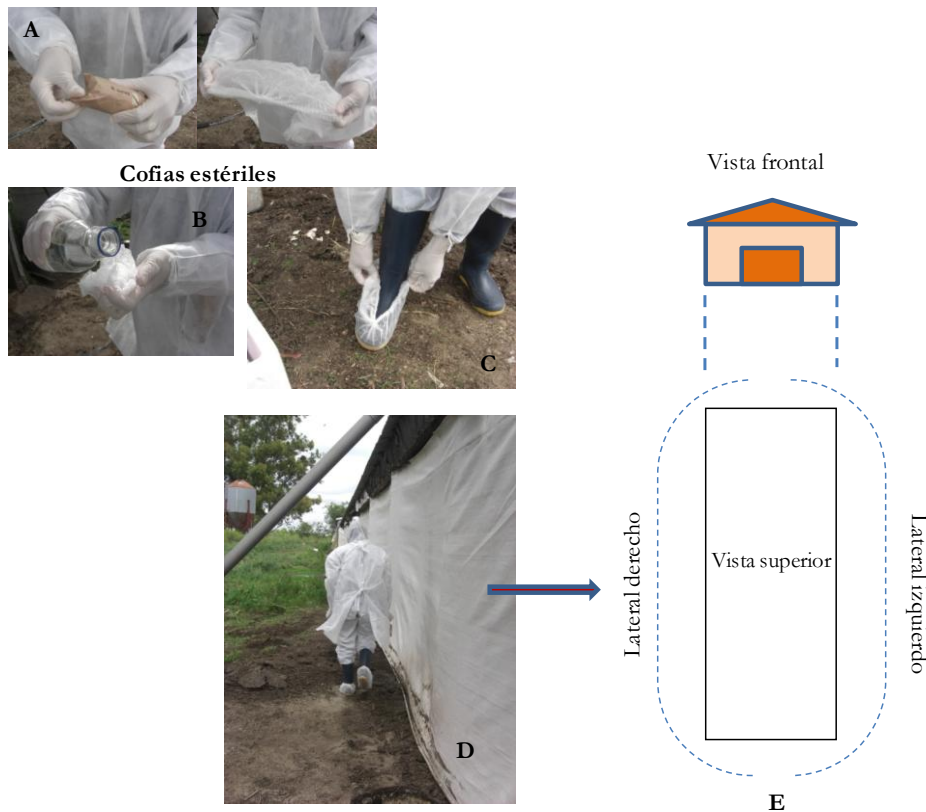


Figura 3.3. Esquema de la toma de muestras de hisopados de arrastre. A y B: cofias estériles embebidas en solución fisiológica. C: colocación de la cofia en la bota. D: caminata por uno de los laterales del galpón. E: se representa por líneas punteadas el trayecto realizado en cada lateral.

3.1.3. Procesamiento y análisis de las muestras

3.1.3.1 Aislamiento de *Salmonella*

- a. Alimento. Cada bolsa con 3 kg de alimento fue procesada por duplicado, tomándose 2 submuestras de 25g de alimento. El aislamiento de *Salmonella* se realizó con el Método TT-alimento de acuerdo a lo descrito en el punto 2.1.3.2.2. del capítulo 2, empleando sólo una incubación de 24 h en el caldo tetrionato y los medios selectivos-diferenciales XLDT y EF-18.
- b. Huevos. De los dos maples de cada galpón, uno de ellos fue utilizado para el cultivo de cáscaras, mientras que el otro se utilizó para el cultivo del contenido. En ambos maples se separaron los huevos en dos grupos de 15 huevos cada uno. Las cáscaras de cada uno de los dos grupos se colocaron en bolsas de plástico estériles. De cada bolsa plástica estéril se tomaron 25 g de muestra que fueron procesadas según lo propuesto por Soria *et al.* (2012), utilizando 225 ml de CTS-Fe como pre-enriquecimiento durante 24 hs. a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A su término 1 ml del caldo fue transferido a 10 ml de caldo tetrionato con solución de yodo, verde brillante y novobiocina e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días. Al día 1 (1° siembra) y 5 (2° siembra), se tomó con ansa del medio de enriquecimiento selectivo y se sembró en los ágaros Hektoen (Acumedia, Lansing, Michigan) y XLD.

Antes de tomar el contenido de los huevos se desinfectaron las cáscaras, primero por inmersión en alcohol etílico al 70% durante 10 minutos e inmediatamente después en agua destilada a 100°C por 5 segundos (Gast, 1993). Luego, los huevos desinfectados de cada grupo fueron quebrados y el contenido de las claras ó yemas (en grupos de 15) introducido por separado en bolsas de plástico estériles donde se homogeneizó (Stomacher 440 circulator, Seward, Inglaterra) durante 2,5 minutos a 2.500 rpm. De cada bolsa estéril se tomó una submuestras de 25 g de clara ó yema para el análisis de las aflatoxinas (ver capítulo 5). Posteriormente, el contenido restante de clara y yema de 15 huevos fue mezclado y se tomó una submuestra de 25 g de la misma. La mezcla fue pre-enriquecida en 225 ml de CTS-Fe, luego cultivada en caldo tetrionato durante 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A su término 1 ml del caldo fue transferido a 10 ml de caldo tetrionato con solución de yodo, verde brillante y novobiocina e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días. Al día 1 (1° siembra) y 5 (2° siembra), se tomó con ansa del medio de enriquecimiento selectivo y se sembró en los ágaros Hektoen (Acumedia, Lansing, Michigan) y XLD durante 24 h

- a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y posteriormente plaqueadas en los agares Hektoen (Acumedia, Lansing, Michigan) y XLD, según lo propuesto por Soria *et al.* (2012).
- c. Excretas. De cada bolsa con 300 ± 50 g de excreta se tomaron 2 submuestras de 25g. Estas submuestras fueron procesadas por el método MSRVR-excreta descrito en el punto 2.1.5.2, utilizando los ágar selectivos-diferenciales XLDT y EF-18.
 - d. Hisopados cloacales. Se juntaron dos pooles de 5 hisopos, correspondientes a la misma hilera ó fila, según sea galpón convencional o automatizado, respectivamente, en un frasco estéril. Se agregaron 50 ml de APT y se lo procesó según la técnica MSRVR-excreta de la misma manera que lo realizado para la excreta.
 - e. Aves muertas. Se realizó la necropsia de las gallinas para obtener muestras de hígado y/o vesícula biliar, bazo y, contenido de ciegos y patas. Los hígados y bazos fueron procesados individualmente y en conjunto. Todos los órganos e hisopados de médula ósea del hueso tarso-metatarso, previamente humedecidos en solución fisiológica estéril (0,85%), fueron sembrados, individualmente por siembra directa, en agar MC (Acumedia) y agar *Salmonella-Shigella* (SS, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Además, se juntaron porciones de los hígados y bazos de las aves de cada galpón en grupo, al igual que los grupos de ciegos de los mismos por separado, y se diluyeron en caldo tetracionato con solución de yodo, verde brillante y novobiocina en relación 1/10. la mezcla se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Luego las muestras fueron sembradas por estrías de agotamiento en placas de agar SS (Merck) y MC (Acumedia).
 - f. Agua. De cada litro de agua proveniente del exterior y/o del interior de los galpones, se tomaron 2 submuestras de 25ml de agua cada uno y se procesaron de acuerdo a lo descrito en el punto 2.1.4.2, utilizando la técnica MSRVR-agua y los ágar selectivos-diferenciales XLDT y EF-18
 - g. Análisis microbiológico de la contaminación del aire: Inmediatamente después del arribo al laboratorio, las placas de agar MC expuestas al ambiente fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas.
 - h. Hisopados de arrastre alrededor del perímetro externo del galpón. Cada bolsa con 2 pares de cofias fue pre-enriquecida en APT (relación 1/10) y luego procesada según la técnica MSRVR-excreta de la misma manera que lo realizado para la excreta.

En todos los casos, se tomaron de cada placa de agar selectivo-diferencial una o dos colonias compatibles con *Salmonella* sp. En caso de no haber colonias bacterianas compatibles con *Salmonella* sp. se tomaron igualmente dos colonias. Luego, se realizaron las

siguientes pruebas bioquímicas: agar TSI, LIA, ONPG, agar citrato de Simmons, medio sulfuro-indol-movilidad (SIM), agar tartrato de Jordan y agar fenilalanina. Además, para las cepas inmóviles, se realizó la prueba de aglutinación con acriflavina (solución 1/1.000) para saber si son cepas lisas ó rugosas, un control de la solución de acriflavina y un control de la bacteria diluido en solución salina al 0,85%. Todos los aislamientos fueron conservados en agar nutritivo hasta su serotipificación. Una granja fue considerada positiva a *Salmonella* sp. cuando esta bacteria se aisló en al menos una de las muestras procesadas.

3.3.1.2. Serotipificación

La serotipificación se realizó según el esquema de Kauffman-White. En primer lugar, los aislamientos en agar nutritivo fueron cultivados en placas de agar SS (Merck KGaA) e incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 h. Posteriormente, se observaron las características y pureza de las colonias en la placa. A partir de allí, se sembraron en ATS y se incubaron a 35 ± 2 °C, durante 24 h. La caracterización del antígeno somático O (AgO) se realizó sobre una placa de vidrio, mientras que la del antígeno flagelar H (AgH) se realizó en tubo.

- ✓ Serotipificación somática (AgO): A partir del cultivo en ATS se verificó que el mismo se encuentre en forma lisa suspendiendo las bacterias en solución salina al 0,85%. Las cepas que correspondieron a colonias lisas (sin autoaglutinación) se colocaron sobre una placa de vidrio junto a 20 µl de los antisueros polivalentes OS-A y OS-B (los cuales nos permiten detectar alrededor del 98% de las serovariedades de *Salmonella* aisladas del hombre y animales). 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 OS-A, se continuó la serotipificación con dos factores del Ag somático O (factores F9 y 4,5).
- ✓ Serotipificación flagelar (AgH). La serotipificación flagelar se realizó a partir de un cultivo en caldo flagelar (CF, Difco, Michigan, Estados Unidos). Desde el cultivo en ATS se sembró en CF e incubó a 37 °C durante 18-24 h. A partir de éste se preparó una alícuota de 0,5 ml en tubo estéril con tapa rosca y conservó a temperatura ambiente. Al resto de CF se agregaron 5 ml de solución fisiológica formolada (Cloruro de sodio 8,5 g, formalina al 37-40 % 10 ml, agua destilada c.s.p. 1000 ml) al 1 %, incubando 1 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). En cuatro tubos de ensayo se colocaron 50 µl de los antisueros flagelares polivalentes HS-A,

HS-D y HS-E (Becton, Dickinson y Co.) y un control sin inocular. Luego se agregó 0,5 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 H (m, i, 2) (Becton, Dickinson y Co.). Las cepas que no aglutinaron a los antisueros polivalentes H, pero fueron positivas a la aglutinación somática, fueron tipificadas como salmonelas inmóviles. Las cepas positivas para el factor somático 9, y factor flagelar m, se consideraron como *S. Enteritidis*.

3.1.3.3 Detección de *Salmonella* sp. en suero.

Los sueros obtenidos a partir de las muestras de sangre fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos en baño maría. Luego se realizó la técnica de aglutinación rápida en placa (ARP, SENASA, 2002), para un “screening” de las aves del galpón en su conjunto, pero no para estudios individuales. Para ello, se siguió el protocolo descrito en el Plan Nacional de Sanidad Avícola, con antígeno de *Salmonella pullorum* (SP, Lohmann Animal Health Int., Winslow, Maine, Estados Unidos) teñido con cristal violeta. La ARP fue realizada a temperatura ambiente (25±2 °C). Para la prueba se colocaron 0,02 ml de antígeno y 0,02 ml de suero diluido en solución fisiológica (relación 1/5) sobre una placa iluminada desde abajo. El suero diluido y el antígeno se mezclaron con palillos de madera y luego se realizaron movimientos suaves con la placa. Los resultados para la prueba ARP fueron registrados dentro de los 2 minutos. En los casos positivos se observó la formación de gránulos, indicando la presencia de anticuerpos contra *Salmonella*. Si durante el tiempo de la prueba no hubo formación de gránulos, el suero se consideró negativo. Se consideró un galpón positivo cuando el 25% o más muestras de los sueros fueron positivas a la prueba.

3.1.3.4. Extracción de ADN

Para las muestras de alimento, huevo, agua y aislamientos de *Salmonella* sp., las extracciones se realizaron según la técnica descrita en el punto 2.1.3.4. En el caso de las muestras de excretas, hisopados de arrastre y cloacales, el procedimiento de extracción fue el descrito en el punto 2.1.5.3 a partir de las placas de enriquecimiento selectivo MSR/V de cada una de estas muestras.

3.1.3.5. Ensayos de PCR

3.1.3.5.1. PCR para *Salmonella* sp.

Todas las extracciones de ADN provenientes de las muestras tomadas en granjas y los aislamientos fueron utilizados como templados para la reacción de amplificación del gen *ImmA* por PCR, utilizando la metodología descrita en la sección 2.1.3.2.5.

3.1.3.5.2. PCR para *Salmonella* 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* Enteritidis, 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 cebador 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 dDNTP (0,2 mM, Fermentas), 0,125 µl de TaqADN polimerasa 5 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción.

Los cebadores empleados para este propósito fueron *Sdf* 1 SE 1063 Forward (5'-TGTGTTTATCTGATGCAAGAGG-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 (*S. Enteritidis* ATCC 13076) y negativo (*E. coli* ATCC 25922). 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.

3.1.3.5.3. PCR múltiple para la detección de *Salmonella* Typhimurium

Las extracciones de las cepas aisladas de granjas, que dieron negativo a la reacción de PCR para *S. Enteritidis*, fueron utilizadas para la amplificación de los genes: *rflj* (primers 5' CCAGCACCAGTTCCTCAACTTGATAC y 5' GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA); *flic* C (5' ATAGCCATCTTTACCAGTTCCCCC y 5' GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC) y *fljB* (primers 5'-ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC y 5'-TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG), cuyos fragmentos tienen un tamaño de 663, 183 y 526 pb, respectivamente. Esta reacción permite la identificación de *S. Typhimurium*,

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 cebador 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 TaqADN polimerasa 1 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Se incluyeron controles positivos (*S. Typhimurium* 06/11) y negativo (*E. coli* ATCC 25922). 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.

3.1.3.5.3. PCR múltiple para la detección de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*

Las extracciones de las cepas serotificadas como inmóviles fueron utilizadas para realizar la amplificación de las regiones polimórficas de los genes *glgC* (primers SG-L 5'GATCTGCTGCCAGCTCAA y SG-R 5'GCGCCCTTTTCAAAACATA) y *speC* (primers 5'CGGTGTACTGCCCGCTAT y 5'CTGGGCATTGACGCAAA). Esta reacción múltiple produce un amplicón de 174 pb específico para *speC* con el biovar Pullorum y dos amplicones de 174 pb y 252 pb específicos para *speC* y *glgC*, respectivamente para el biovar *S. Gallinarum*. La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con buffer de reacción 1X (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Fermentas) y 0,125 µl de TaqADN polimerasa 1 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Se incluyeron controles positivos (*S. Gallinarum* y *S. Pullorum*) y negativo (*E. coli* ATCC 25922). Las condiciones de reacción fueron las descritas por Kang *et al.* (2011). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 94°C en 5 min; 30 ciclos de amplificación a 94°C en 30 seg, alineamiento a 65°C en 30 seg, extensión a 72°C en 30 seg; extensión final a 72°C en 7 min.

Todos los productos de reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (BioRad, España) igual que en el punto 2.1.3.2.5.

3.1.4. Estudio de capacidad discriminatoria y concordancia

De acuerdo a lo descrito en los puntos 2.1.6 y 2.1.7, se calcularon la Se, Pre y concordancia de los medios agarizados selectivos-diferenciales. En el caso de las técnicas de aislamiento y PCR se realizó sólo el cálculo de concordancia. Se consideró VP cuando la

muestra fue positiva a *Salmonella* sp. en al menos un medio de cultivo selectivo-diferencial, mientras que el VN fue aquel en donde la muestra fue negativa a esta bacteria en ambos medios de cultivo selectivos-diferenciales utilizados.

3.2. Resultados

Considerando una granja como positiva al aislamiento de *Salmonella* sp. en al menos uno de los tipos de muestras, la prevalencia encontrada fue del 60 % (18 granjas positivas a *Salmonella* sp. sobre un total de 30 granjas). Sin embargo, sobre un total de 1.963 muestras analizadas para aislamiento de *Salmonella*.sp., sólo el 9,2% de las mismas (180) fueron positivas a esta bacteria. La muestra hisopado de arrastre fue la que presentó mayor porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* sp. con un 32,5%, mientras que no hubo aislamientos compatibles con esta bacteria en muestras de huevo, agua y de aire (Tabla 3.3). Por su parte, se analizaron 888 muestras por PCR, detectándose el 5,1% (45) positivas a *Salmonella* sp. Ninguna muestra fue positiva utilizando biología molecular para esta bacteria en alimento, huevo y agua. De igual manera que en el aislamiento, el mayor porcentaje de muestras positivas fue en muestras de hisopados de arrastre.

Tabla 3.3. Porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* por aislamiento y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), según tipo de muestra.

Origen de la muestra	Tipo de muestra	% muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp. por aislamiento	% muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp. por PCR
Ambiente del galpón	excretas	15,2	13,6
	alimento	4,9	0
	hisopados de arrastre	32,5	35,0
	Huevo (cáscara y contenido)	0	0
	agua	0	0
	aire	0	N.R.
Aves del galpón	hisopados cloacales	3,6	3,6
	hígados	7,4	N.R.
	bazos	5,9	N.R.
	hígado-bazo	10,8	N.R.
	contenido de ciegos	8,6	N.R.
	médula ósea	4,0	N.R.
	vesícula biliar	3,0	N.R.
Porcentaje total de positivos a la detección de <i>Salmonella</i> sp.		9,2	5,1

N.R.: no realizado.

Considerando las muestras provenientes del ambiente de los 40 galpones (Tabla 3.4), el mayor número de positivos por aislamiento se encontró en las muestras de excreta, seguida del alimento y los hisopados de arrastre. La mayoría de las granjas positivas lo fueron en dos tipos de muestras ambientales, en general, excretas e hisopados de arrastre. Casi todas estas muestras se detectaron tanto por bacteriología como PCR. Sólo las granjas 17 y 19 fueron positivas para tres de las muestras ambientales. En cinco de los establecimientos, *Salmonella* se detectó en sólo una de los seis tipos de muestras ambientales. La granja 13, fue únicamente positiva en los hisopados de arrastre por PCR. Por otro lado, en total fueron analizados 1.140 huevos, separados en 76 grupos de 15 huevos cada uno. Ninguna de estas 152 muestras de contenido de huevo o cáscara fueron positivas a *Salmonella* sp. Lo mismo ocurrió para los cultivos ambientales desde aire y agua, sólo aislándose en MC otras bacterias, tales como coliformes, *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp.

En la Tabla 3.5 se observa los resultados para las muestras de sueros y órganos. En total se analizaron 141 aves. En general, las muestras de hígados, bazo y médula ósea fueron simultáneamente positivas en todas las aves estudiadas. Con relación a los sueros, sólo 3 granjas (granjas N° 4, 7 y 23) tuvieron un porcentaje de positividad igual o mayor al 25% con respecto a la presencia de anticuerpos contra *Salmonella*. Sin embargo, se debe señalar que en 4 granjas (granjas N° 14, 19, 20, 27 y 28), aunque los porcentajes de positividad fueron menores al 25%, hubo aislamiento de *Salmonella* en muestras ambientales y de órganos.

Tabla 3.4. Resultados obtenidos por aislamiento (Ais) y detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de *Salmonella* sp. en muestras de alimento, excreta, hisopados de arrastre, agua y huevo provenientes de granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

N° Granja	N° interno de Galpon ¹	N° de muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp./N° total de muestras procesadas ²										
		Alimento		Excreta		Hisopados de arrastre		Agua		Huevo		Placas ambientales
		Ais	PCR	Ais	PCR	Ais	PCR	Ais	PCR	Ais	PCR	Ais
1	2	0/6	0/6	0/6	0/6	0/1	0/1	0/4	0/4	0/4	0/4	0/10
2	1	0/2	0/2	0/8	0/8	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/15
3	4	1/8	0/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/4	0/4	sm ⁴	sm	0/10
	5	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
4	1	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
5	9	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/6
	10	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/6
6	5	0/2	0/2	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/6
7	Sd ³	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
8	1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
9	Sd	0/6	0/6	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
10	5	0/12	0/12	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	8	0/12	0/12	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
11	1	0/12	0/12	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	6	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
12	3	0/6	0/6	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
13	3	0/6	0/6	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
14	3	0/4	0/4	1/4	1/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
15	1	0/8	0/8	1/4	1/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/6

Tabla 3.4.(Continuación).

N° Granja	N° interno de Galpón ¹	N° de muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp./N° total de muestras procesadas ²										
		Alimento		Excreta		Hisopados de arrastre		Agua		Huevo		Placas ambientales
		Ais	PCR	Ais	PCR	Ais	PCR	Ais	PCR	Ais	PCR	Ais
16	1	0/12	0/12	2/6	2/6	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	10	0/4	0/4	0/4	1/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
17	1	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	sm	sm	0/10
	6	3/4	0/4	4/4	4/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
18	2	0/12	0/12	0/6	0/6	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
19	Sd ³	1/16	0/16	1/8	1/8	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/15
20	2	0/8	0/8	3/4	3/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	5	0/4	0/4	0/4	2/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
21	1	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
22	Sd	0/16	0/16	0/8	0/8	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/15
23	1	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
24	8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	2	0/8	0/8	0/4	0/4	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
25	2	0/8	0/8	0/6	0/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
26	10	2/12	0/12	4/6	2/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
27	5	0/12	0/12	3/6	1/6	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
28	5	0/8	0/8	3/4	1/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
	2	0/8	0/8	2/4	2/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
29	2	0/4	0/4	0/4	0/4	1/1	1/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
30	1	8/12	0/12	6/6	6/6	0/1	0/1	0/2	0/2	0/4	0/4	0/10
Total de muestras analizadas		15/304	0/304	30/198	27/198	13/40	14/40	0/84	0/84	0/152	0/152	0/389

¹Número correspondiente a la numeración de galpón propia de la granja

²El número total de muestras procesadas incluye las réplicas de cada muestra. ³Sd= sin dato. ⁴sm= sin muestras

Tabla 3.5. Resultados de la aglutinación rápida en placa con sueros y de los aislamientos y detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de *Salmonella* sp. obtenidos a partir de hisopados cloacales y órganos de gallinas ponedoras.

N° granja	N° interno de galpón ¹	N° aves muertas	N° de muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp. /N° total de muestras procesadas								
			sueros	hisopados cloacales ²		Órganos (Aislamiento)					
				Aislamiento.	PCR	hígado	bazo	hígado-bazo ³	ciegos ³	médula ósea	vesicular biliar
1	2	5	1/15	0/3	0/3	0/5	0/5	0/1	0/1	0/10	NR ⁴
2	1	13	3/20	0/4	1/4	0/10	0/10	0/1	0/1	0/20	NR
3	4	sin muestra	0/10	0/2	0/2	-	-	-	-	-	-
	5	5	0/10	0/2	0/2	0/5	0/5	0/1	0/1	0/10	NR
4	1	1	1/4	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	NR
5	9	9	0/10	0/2	0/2	0/9	0/9	0/1	0/1	0/18	NR
	10	7	0/10	0/2	0/2	0/7	0/7	0/1	0/1	0/14	NR
6	5	8	0/10	0/2	0/2	2/8	2/8	0/1	0/1	3/16	NR
7	sin dato	4	6/10	0/2	0/2	1/4	1/4	0/1	0/1	2/8	NR
8	1	1	1/10	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	NR
9	sin dato	3	0/10	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/6	NR
10	5	1	0/15	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	NR
	8	sin muestra	0/15	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-
11	1	2	0/15	0/3	0/3	0/2	0/2	0/1	0/1	0/4	NR
	6	2	0/10	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/4	NR
12	1	3 ⁵	0/15	0/3	0/3	2/3	1/3	1/2	0/1	0/6	NR
13	3	1	0/15	0/3	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	NR
	5	sin muestra	0/15	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-
14	3	2	2/15	1/4	1/4	0/2	0/2	0/1	0/1	0/4	NR
15	1	1	0/10	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	NR

Tabla 3.5. (Continuación)

N° granja	N° de galpón ¹	N° aves muertas	N° de muestras positivas/N° total de muestras procesadas								
			sueros	hisopados cloacales ²		órganos					
				Aislamiento	PCR	hígado	bazo	hígado-bazo ³	ciegos ³	médula ósea	vesiculabiliar
16	1	8	0/20	0/3	0/3	0/8	0/8	0/1	0/1	0/16	0/8
	10	5	0/15	0/4	0/4	0/5	0/5	0/1	0/1	0/10	0/5
17	1	8	0/10	0/2	0/2	0/8	0/8	0/1	0/1	0/16	0/8
	6	8	0/20	2/4	2/4	1/8	1/8	0/1	0/1	0/16	0/8
18	2	1	0/20	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1
19	sin dato	sin muestra	2/15	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-
20	2	6	1/20	0/2	0/2	1/6	1/6	1/1	1/1	2/12	0/6
	5	5	0/10	0/4	0/4	0/5	0/5	0/1	0/1	0/10	0/5
21	1	1	0/10	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	NR
22	sin dato	4	0/20	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/8	NR
23	1	3	3/10	0/2	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1	0/6	NR
24	8	2	0/20	0/4	0/4	0/2	0/2	0/1	0/1	0/4	0/3
	2	1	2/10	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1
25	2	7	0/10	0/2	0/2	0/7	0/7	0/1	0/1	0/14	0/7
26	10	10	0/15	0/3	0/3	0/10	0/10	0/1	0/1	0/20	0/10
27	5	sin muestra	1/15	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-
	5	1	0/20	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1
	2	1	2/10	0/4	0/4	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1
29	2	1	0/10	1/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1/1
30	1	1	0/15	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1
Total de muestras analizadas		141	25/539	4/110	4/110	8/136	8/136	4/37	3/35	11/276	2/66

¹ Número correspondiente a la numeración de galpón propia de la granja

² Cada muestra corresponde a un grupo de 10 hisopados. ³ grupo de n órganos. ⁴ NR= no realizado ⁵ Se muestreó 1 ave muerta del galpón N° (interno) 1 y dos aves muertas de otros galpones del establecimiento, cuyos grupos de hígado-bazo fueron procesados de manera separada..

Tabla 3.6. Sensibilidad y Precisión relativas para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF18, MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS) utilizados en las distintas muestras de granjas.

Tipo de muestra	Medio selectivo	Sensibilidad	Precisión
Alimento	XLDT	0,46 ^a (0,24-0,69)	0,98 ^a (0,95-0,98)
	EF18	0,86 ^b (0,61-0,95)	0,99 ^a (0,96-0,99)
Excretas	XLDT	0,70 ^a (0,51-0,83)	0,95 ^a (0,91-0,97)
	EF18	1,00 ^b (0,88-0,99)	1,00 ^a (0,98-0,99)
Hisopados cloacales	XLDT	1,00 ^a (0,39-0,99)	1,00 ^a (0,96-0,99)
	EF18	1,00 ^a (0,39-0,99)	1,00 ^a (0,96-0,99)
Hisopados de arrastre	XLDT	1,00 ^a (0,76-0,99)	0,95 ^a (0,84-0,98)
	EF18	0,76 ^b (0,49-0,91)	0,93 ^a (0,81-0,97)
Hígado	MC	1,00 ^a (0,-0,96)	1,00 ^a (0,66-0,99)
	SS	0,87 ^a (0,51-0,96)	0,99 ^a (0,93-0,99)
Bazo	MC	1,00 ^a (0,66-0,99)	0,99 ^a (0,97-0,99)
	SS	1,00 ^a (0,66-0,99)	0,99 ^a (0,93-0,99)
Médula ósea	MC	1,00 ^a (0,73-0,99)	1,00 ^a (0,98-0,99)
	SS	0,72 ^b (0,42-0,90)	0,98 ^a (0,96-0,99)
Contenido de ciegos	MC	0,67 ^a (0,19-0,93)	0,97 ^a (0,39-0,99)
	SS	1,00 ^a (0,85-0,99)	0,97 ^a (0,85-0,99)
Grupo de hígado-bazo	MC	1,00 ^a (0,47-0,99)	1,00 ^a (0,90-0,99)
	SS	1,00 ^a (0,47-0,99)	1,00 ^a (0,90-0,99)

^{a,b} Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0.05$).

En la Tabla 3.6 se observan los parámetros de Se y Pre para los medios selectivos-diferenciales empleados por cada tipo de muestra. La Pre estuvo entre 0,93 y 1 sin diferencias para ninguno de los medios utilizados. En relación a la sensibilidad de los medios XLDT y EF18, se encontró diferencia estadística a favor del EF18 en las muestras de alimento y excretas con valores de 0,86 y 1, respectivamente. Para las muestras de

hisopado de arrastre, el medio XLDT fue superior al EF18 mostrando un valor de Se igual a 1. En cuanto al desempeño de los medios MC y SS en muestras de órganos ambos tuvieron valores de Se de 1 en las muestras de hígado, bazo y grupos de hígado-bazo. Para las muestras de médula ósea, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los ágaros MC y SS con valores de Se de 1 y 0,72, respectivamente. No pudo detectarse diferencia estadística entre los medios MC y SS para el contenido de ciego por ser pocas las muestras positivas.

Tabla 3.7. Concordancia entre los medios agarizados selectivos-diferenciales utilizados para la detección de *Salmonella* sp. en los distintos tipos de muestras.

Tipo de muestra	Comparación	Índice Kappa
Alimento	XLDT-EF18	0,48*
Excretas		0,80*
Hisopados cloacales		1,00*
Hisopados de arrastre		0,81*
Hígado	MC-SS	0,93*
Bazo		1,00*
Médula ósea		0,83*
Ciegos		0,78*
Grupol hígado-bazo		1,00*

*indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($P < 0,05$)

XLDT=agar xilosa-lisina desoxicolato; EF18= agar EF18; MC=agar MacConkey; SS=agar Salmonella-Shigella

En la Tabla 3.7 se muestra el análisis de concordancia entre los medios selectivos-diferenciales utilizados. La misma fue débil para los medios XLDT-EF18 en alimento, mientras que resultó muy buena a excelente para hisopados de arrastre, hisopados cloacales y excreta. Los agares MC y SS tuvieron una concordancia muy buena a excelente en las muestras de hígado, bazo, grupo de hígado-bazo y médula ósea Sólo en contenido de ciego, la concordancia fue buena. La evaluación de la concordancia entre los métodos de cultivo y PCR para la detección de *Salmonella* en los diferentes tipos de muestras se presenta en la Tabla 4.8. Al no encontrarse positivos por PCR en las muestras de alimento, la concordancia fue nula entre las técnicas para este tipo de muestra. Por otro lado, en las muestras de hisopados de arrastre, hisopados cloacales y excreta, la concordancia fue buena entre los métodos MSRv-excreta y MSRv-PCR.

Tabla 3.8. Concordancia entre los métodos tetrionato- alimento (TT-alimento), Reacción en Cadena de la Polimerasa-alimento (PCR), Rappaport- Vassiliadis semisólido modificado en excreta (MSRV-excreta) y PCR a partir de MSRV (MSRV-PCR) utilizados para la detección de *Salmonella* sp. en los distintos tipos de muestras.

Tipo de muestra	Comparación	Índice Kappa
Alimento	TT-alimento/PCR	0,00
Excretas	MSRV-excreta/MSRV-PCR	0,65*
Hisopados cloacales		0,74*
Hisopados de arrastre		0,76*

*indica que Kappa es significativamente distinto de cero ($P < 0,05$)

En la Tabla 3.9 se observan los resultados de la serotipificación y PCR para los 201 aislamientos obtenidos a partir de las distintas muestras. Pudieron serotipificarse 33 aislamientos como *S. Enteritidis*, todos positivos a la reacción de PCR para el mismo serotipo, estando presente tanto en muestras ambientales como en órganos de los animales. Además, los 40 aislamientos de cepas inmóviles se serotipificaron como *S. Gallinarum*, todos positivos a la PCR para esta biovariedad, y sólo fueron aislados de los órganos de los animales. Del total de aislamientos, 46 se consideraron no *S. Enteritidis* por ser negativos a los factores somáticos (factor 9) y flagelares (factor m) de dicho serotipo. Ochenta y dos aislamientos no pudieron ser serotipificados por no contar con más antisueros disponibles en el laboratorio. Todas las cepas fueron positivas a la amplificación por PCR a nivel de género. Las PCR para *S. Typhimurium* y *S. Pullorum* no resultaron positivas en ninguno de los casos. Por otro lado, sólo en 6 granjas (granjas N° 14, 16, 20, 26, 27 y 30) se aislaron más de un serotipo de *Salmonella*.

Tabla 3.9. Resultados de la serotipificación y PCR para los aislamientos obtenidos de granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos. S= *Salmonella* sp., SE= *S. Enteritidis*, SG= *S. Gallinarum*, S.P=*S. Pullorum*, NoSE= no *S. Enteritidis*, NR= no realizado

N° de granja positiva a <i>Salmonella</i>	Origen de los aislamientos compatibles con <i>Salmonella</i> sp.	Serotipificación					N° positivos a PCR				
		SE	SG	SP	No SE	NR	S	S.E	S.T	S.G	S.P
2	hisopado de arrastre	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
3	alimento	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
6	patas	0	5	0	0	0	5	0	0	5	0
	hígado	0	5	0	0	0	5	0	0	5	0
	bazo	0	6	0	0	0	6	0	0	6	0
7	médula ósea	0	3	0	0	0	3	0	0	3	0
	hígado	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0
	bazo	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0
12	hígado	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
	bazo	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0
	contenido de ciegos	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
13	patas	0	3	0	0	0	3	0	0	3	0
	hígado	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
	bazo	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0
	ciegos	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0
	hígado+bazo	0	3	0	0	0	3	0	0	3	0
14	excretas	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0
	hisopado de arrastre	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0
	hisopado cloacal	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0
15	excreta	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
16	excreta	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0
	hisopado de arrastre	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0
17	alimento	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0
	excreta	0	0	0	8	0	8	0	0	0	0
	hisopado de arrastre	0	0	0	3	1	4	0	0	0	0
	hisopado cloacal	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0
	hígado	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	bazo	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0
	contenido de ciegos	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0
hígado+bazo	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	

Tabla 3.9. Continuación

Nº de granja positiva a <i>Salmonella</i>	Origen de los aislamientos compatibles con <i>Salmonella</i> sp.	Serotipificación					Nº de positivos a PCR					
		SE	SG	SP	No SE	NR	S	S.E	S.T	S.G	S.P	
18	hisopado de arrastre	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	
19	alimento	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	excreta	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	
	hisopado de arrastre	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
20	excreta	0	0	0	6	0	6	0	0	0	0	
	hisopado de arrastre	0	0	0	3	1	4	0	0	0	0	
	médula ósea	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	
	hígado	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	
	bazo	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
	hígado+bazo	3	0	0	0	0	3	3	0	0	0	
	contenido de ciegos	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	
26	alimento	0	0	0	0	3	3	2	0	0	0	
	excreta	5	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
	hisopado de arrastre	0	0	0	1	3	4	2	0	0	0	
27	excreta	0	0	0	1	3	4	3	0	0	0	
	hisopado de arrastre	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	
28	excreta	2	0	0	0	3	5	5	0	0	0	
	hisopado de arrastre	3	0	0	0	4	7	7	0	0	0	
	médula ósea	0	0	0	0	8	8	8	0	0	0	
	hígado	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0	
	bazo	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0	
	hígado+bazo	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0	
	ciegos	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0	
	vesicula biliar	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0	
29	hisopado de arrastre	0	0	0	0	3	3	3	0	0	0	
	contenido de ciegos	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	
30	alimento	0	0	0	2	9	11	3	0	0	0	
	excreta	0	0	0	1	11	12	1	0	0	0	
Total		33	40	0	46	82	201	87	0	40	0	

3.4. Discusión

En el presente estudio se recolectaron diferentes tipos de muestras (alimento, materia fecal, hisopados de arrastre, huevos, agua, aire, hisopados cloacales y órganos) con

el fin de estimar la prevalencia de *Salmonella* sp. en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos. Considerando que una granja es positiva cuando *Salmonella* sp. se aísla en al menos una muestra, en este trabajo el 60 % de las granjas fueron positivas a esta bacteria. En nuestro país, no existen datos oficiales previos para la prevalencia de salmonelosis en aves de postura. Según datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la prevalencia de granjas infectadas en ese país fue de 19,2 % (USDA, 2005). Van Hoorebeke *et al.* (2010) encontraron 29 (9,9%) granjas positivas a *Salmonella* sp. para distintos países de Europa, sobre un total de 292 granjas muestreadas. Se debe señalar que estos últimos autores basaron su estudio solamente en muestras de hisopados cloacales y materia fecal. Considerando sólo a los mismos tipos de muestras que en el estudio anterior, 11 granjas (37%) de gallinas postura de Entre Ríos tuvieron muestras positivas a *Salmonella* en este trabajo de Tesis. En realidad, al sumar diferentes tipos de muestra, este estudio de Tesis incrementó la probabilidad de detección del patógeno.

El monitoreo ambiental se ha convertido en un método útil para predecir una potencial infección o colonización por salmonelas paratíficas en un lote de aves (Waltman y Gast, 2008). Este tipo de monitoreo se considera más efectivo y sensible que el muestreo de un número limitado de aves (Carrique-Mas y Davies, 2008). Sin embargo, aunque el muestreo ambiental evidencia la presencia de *Salmonella* sp., se trata de un indicador indirecto y el lote no debe ser diagnosticado como infectado basándose únicamente en resultados ambientales (Waltman y Gast, 2008). Basado en este criterio, sólo 8 granjas (27%) de las 30 estudiadas en este trabajo de Tesis tuvieron muestras positivas a *Salmonella* sp. en muestras de los animales.

La reglamentación de la Unión Europea (UE, 2011) para el monitoreo de *Salmonella* sp. en aves ponedoras recomienda la recolección de excretas frescas y muestras de polvo adherido a hisopados de arrastre. Las muestras de excretas (especialmente frescas) indican una infección reciente, mientras que muestras positivas en hisopados de arrastre pueden indicar una infección previa (Carrique-Mas y Davies, 2008). En nuestro trabajo, de las 14 granjas positivas a *Salmonella* sp. en excretas y/o hisopados de arrastre, en 9 de ellas se aisló este patógeno en ambos tipos de muestras y de estas últimas sólo en 2 granjas también resultaron positivas a *Salmonella* en muestras de hisopado cloacal. Resultados similares fueron reportados por Schulz *et al.* (2011) al investigar la presencia de *Salmonella* a lo largo de un ciclo de postura. Estos autores 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 de las excretas, 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* sp. 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 materia fecal de varios sitios del galpón, mezcladas en una muestra conjunta, aumenta las chances de incluir excretas con un alto número de salmonelas, ya que compensa la baja prevalencia de esta infección que usualmente se registra a nivel individual. De todos modos, no se debería dejar de lado el hecho de tomar muestras provenientes de hisopados cloacales, sobre todo cuando se detectan individuos enfermos o debilitados.

En nuestro estudio, cuatro granjas fueron positivas a *S. Gallinarum* en muestras de órganos de aves muertas, aunque fueron negativas en el resto de las muestras. Como se indicó en los capítulos previos las técnicas que se utilizaron en agua, alimento y excreta pueden subestimar la presencia de esta biovariedad a la hora de definir una granja libre de *Salmonella*. 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 *S. Gallinarum* se transmite principalmente vía vertical (Barrow y Freitas Neto, 2011). Orr y Moore (1953) demostraron que *S. Gallinarum* puede permanecer viable en el ambiente de la granja el tiempo suficiente como para producir la recurrencia de la enfermedad. Si bien *S. Gallinarum* no tiene implicancia en salud pública, el hallazgo de esta enfermedad cobra mucha 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 tifosis aviar son escasos, debido a que la enfermedad no es informada y por lo tanto su incidencia real está subestimada (Barrow y Freitas Neto, 2011).

La persistencia de salmonela 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* sp. 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). En estudios experimentales, la infección del tracto intestinal hacia los órganos como hígado y bazo ocurre en pocas horas después de la infección por vía oral y sirve de conexión para la subsecuente contaminación del tejido reproductivo. Sin embargo, la colonización intestinal persistente no predice una infección sistémica o contaminación del

huevo por *S. Enteritidis* en especial. Distintos trabajos experimentales o sobre granjas positivas a *Salmonella* sp. 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 ó contenido de huevo fue baja (García *et al.*, 2011, Gast *et al.*, 2013). En el estudio de esta Tesis, si bien el porcentaje de granjas positivas sobre el total de granjas fue alto, ninguna de las muestras de huevo examinadas, tanto de cáscara como de contenido, resultó positiva al aislamiento y detección por PCR de *Salmonella* sp. Además, sólo en dos de las granjas muestreadas (granjas N° 17 y 18) se confirmó la presencia de *S. Enteritidis*, tanto en las muestras de hisopados de arrastre y materia fecal como en muestras de órganos de las aves muertas recolectadas en el mismo día del muestreo.

Gast *et al.* (2011c) señalaron que una de las principales fuentes de contaminación ambiental ocurre como consecuencia de la diseminación a través de las excretas de las aves infectadas. La presencia de *S. Enteritidis* en la materia fecal y órganos representa una potencial fuente de contaminación horizontal del huevo. La contaminación interna mediante la transmisión de *S. Enteritidis* a través de los poros o fisuras presentes en la cáscara de los huevos constituye un riesgo inminente de contaminación en humanos. Los problemas potenciales de salud pública se presentan cuando las gallinas ponedoras comerciales se encuentran inmunosuprimidas. Bajo dichas condiciones, se observa un estado de bacteriemia con aislamiento de *S. Enteritidis* del hígado, bazo, ovario y oviductos (Alvarado, 2009), lo que pudo haber ocurrido en este estudio de Tesis, aun cuando no se midió los anticuerpos contra este patógeno en la yema.

La recolección durante el muestreo de los huevos producidos en las granjas tiene la ventaja de ser una medida directa y con sentido epidemiológico de la sanidad del establecimiento avícola, en contraposición con otras muestras ambientales, que sólo evalúan el potencial del lote para producir huevos contaminados. Sin embargo, se ha observado que las gallinas naturalmente infectadas producen huevos contaminados en muy bajas frecuencias (Gast y Beard, 1993). Debido a esta baja prevalencia de *Salmonella* sp. en huevos, a menudo los contenidos de 10 ó 20 huevos son agrupados para formar una sola muestra (Waltman y Gast, 2008), criterio que se utilizó en este estudio de Tesis. Humphrey *et al.* (1991b) aislaron *S. Enteritidis* del contenido de huevo en proporciones menores al 1% luego de analizar 5.700 huevos provenientes de 15 granjas de gallinas ponedoras. Betancor *et al.* (2010) encontraron 58 muestras positivas de 620 grupos de 20 huevos cada uno, mostrando una prevalencia de al menos un huevo contaminado por cada 214 huevos. Soria (2012) evaluó la prevalencia de *Salmonella* en huevos comercializados en supermercados, encontrando 29 muestras positivas de un total de 1.643 muestras analizadas. Por otro lado,

Poppe *et al.* (1992) analizaron los huevos producidos en un día de postura por dos lotes de gallinas. En el primer lote, no encontraron muestras positivas en 2.520 huevos analizados en grupos de 5, mientras que en el segundo lote analizaron 14.040 huevos y sólo un grupo muestral fue positivo a *S. Enteritidis*. Estos autores concluyeron que la prevalencia de este serotipo en los huevos varió entre 0,012 y 0,054%. Los resultados negativos en las muestras de huevo analizadas en esta Tesis coinciden con la baja prevalencia encontrada en la literatura. Además, se deberían medidas de control en aquellas granjas en las cuales *S. Enteritidis* (y/o *S. Gallinarum*) fue aislada en las aves muertas.

Koyunku *et al.* (2010) compararon técnicas de PCR y de cultivo con ensayos de inoculación de alimento y luego en muestras naturalmente contaminadas. Estos autores encontraron excelentes concordancias entre las técnicas para los ensayos de inoculación, mientras que para las muestras naturalmente infectadas los valores de concordancia fueron relativamente bajos. En nuestro estudio, todas las muestras de alimento positivas por la técnica TT-alimento, no pudieron detectarse por medio de la PCR. Esto pone en evidencia que en este tipo de muestra y, en particular, para los estudios epidemiológicos, los métodos de PCR deben utilizarse como una herramienta paralela al aislamiento bacteriológico.

En cuanto al desempeño de los medios agarizados selectivos-diferenciales, en particular para el aislamiento de salmonelas a partir de órganos, los ágares MC y SS mostraron valores altos de Se y Pre relativa. 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, el agar MC, se considera menos inhibidor. Cox *et al.* (1972) evaluaron el desempeño del agar SS en muestras de excretas 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 flora acompañante no representó ningún problema cuando las muestras fueron sembradas sobre los ágares SS o MC, medios de cultivo que tuvieron altos valores de sensibilidad y precisión, por lo que se considera que son adecuados para este tipo de muestras. Sin embargo, la Se fue mayor en agar MC que en SS en muestras de médula ósea, quizás debido a la menor selectividad del medio.

Agron *et al.* (2001) diseñaron los pares de cebadores *Sdf I* para la identificación de *S. Enteritidis* basados en una secuencia cromosómica única de este serotipo. Estos autores probaron el par de cebadores en 33 aislamientos de *S. Enteritidis* de distinto origen y todos resultaron positivos. Además, 74 aislamientos correspondientes a otros serotipos no produjeron la amplificación esperada del fragmento de 304 pb. Otros autores demostraron

la efectividad de estos cebadores para la detección de *S. Enteritidis* en diferentes estudios y metodologías (Alvarez *et al.*, 2004; Trufny *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2007, 2008; Tennant *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2011). En este estudio de Tesis, 33 de los aislamientos se identificaron como *S. Enteritidis* mediante serotipificación y PCR. Otros 54 aislamientos que fueron confirmados sólo a nivel de género, resultaron positivos a la reacción por PCR para *S. Enteritidis*.

Por otro lado, Kang *et al.* (2011) demostraron un 100% de sensibilidad para la reacción de doble PCR que diferencia los biovares *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* entre sí. Estos resultados concuerdan con los de este trabajo de Tesis, ya que todos los aislamientos compatibles con *S. Gallinarum* por pruebas bioquímicas y serotipificación fueron también positivos a la reacción por PCR específica para esta biovariedad. Además, los aislamientos compatibles con este biovar resultaron positivos a la acriflavina, lo que indicaría que se podría tratar de cepas vacunales (vacuna 9R), lo cual no fue estudiado más profundamente en este trabajo de Tesis.

Poppe *et al.*(1992) emplearon la prueba de aglutinación con antígeno de *S. Pullorum* en granjas contaminadas con el serotipo *S. Enteritidis*, encontrando altos porcentajes de seropositividad. En nuestro estudio de Tesis, sólo tres de las granjas examinadas fueron positivas a esta prueba. En aquellas granjas en las cuales la seropositividad fue menor al 25%, en general, las muestras ambientales y los órganos de las aves muertas, resultaron positivos a *Salmonella*. Esto demuestra que los resultados de los aislamientos constituyen los un criterio determinante para asignar a una granja el diagnóstico de contaminación con *Salmonella* sp.

3.5. Conclusiones

- ✓ La prevalencia de *Salmonella* en las granjas de gallinas de postura de Entre Ríos es del 60%.
- ✓ Aun con altos porcentajes de granjas contaminadas por *Salmonella*, puede no detectarse este patógeno en las muestras de huevo de las mismas.
- ✓ La presencia de *S. Enteritidis* y *S. Gallinarum* en los establecimientos avícolas estudiados evidencia la necesidad de tener que incluir distintos tipos de muestras para mejorar el diagnóstico y, de esta manera, establecer medidas preventivas y de control, orientadas a proteger la salud pública y la producción de huevos.
- ✓ Aunque la presencia de *Salmonella* spp. en el ambiente de una granja puede ser muy variable, las muestras de hisopados de arrastre, excreta, y alimento son adecuadas, en su conjunto, para el monitoreo ambiental, sobre todo porque representan una de

las vías de entrada del patógeno a la granja (alimento) y la diseminación del mismo por las aves hacia el ambiente (excretas e hisopados de arrastre).

- ✓ Dada la nula a buena concordancia entre las técnicas de cultivo de *Salmonella* sp. y las de PCR, éstas últimas no deben ser utilizadas como únicas pruebas de diagnóstico.
- ✓ En general, los ágares selectivos diferenciales MC y SS son similares en cuanto a Se y Pre para el aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de muestras órganos por lo que podrían ser utilizados indistintamente.
- ✓ Los ágares selectivos diferenciales XLDT y EF 18 no son similares en cuanto a Se y Pre para el aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de muestras de alimento, excretas e hisopados de arrastre. Por ello, para el caso del alimento, se recomienda la utilización de estos dos tipos de medios de cultivo a fin de mejorar la recuperación de este patógeno a partir de estos tipos de muestras.

Capítulo 4

Determinación de aflatoxinas en clara y yema de huevos de granjas de gallinas ponedoras.

Las aflatoxinas afectan a todas las especies de aves de corral. Las especies de *Aspergillus* productoras de aflatoxinas son reconocidas como los principales contaminantes de los granos utilizados en las raciones para la producción avícola. En las gallinas de postura, la contaminación del alimento con aflatoxinas puede reducir la producción de huevos, además de afectar al sistema inmune. Por otro lado, se debe prestar especial atención al uso de raciones contaminadas, ya que el pasaje de las aflatoxinas al huevo presenta un peligro potencial para la salud de los consumidores (Salwa y Anwer, 2009).

Para el análisis de las micotoxinas en huevo se debe tener en cuenta que éste constituye una matriz compleja (Garrido Frenich *et al.*, 2011). En este sentido, la clara de huevo o albumen representa el 60 % del peso total del huevo, siendo agua y proteínas sus principales componentes. Las proteínas de la clara incluyen ovoalbúmina, ovotransferrina y ovomucoide, ovomucina (responsable de la viscosidad del albumen), lisozima, avidina, cistatina, ovoinhibidores y ovomacroglobulina. En cuanto a la yema de huevo, sus principales constituyentes son proteínas y lípidos, presentes principalmente en la forma de lipoproteínas. Estos pueden ser divididos en una fracción granular y una fracción de plasma. Los gránulos contienen α y β lipovitelinas. El plasma contiene lipoproteínas de baja densidad y una fracción soluble en agua con lípidos libres y proteínas globulares (inmunoglobulinas). Además la yema contiene minerales, carbohidratos y pigmentos (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).

Los trabajos referidos a las técnicas para la detección de aflatoxinas en huevos son escasos (Trucksess y Stoloff, 1983; Scussel, 2003; Garrido Frenich *et al.*, 2011; Capriotti, *et al.*, 2012), mientras que los datos existentes sobre las concentraciones de toxina en este tipo de alimento provienen de ensayos experimentales (Bintvihok, *et al.*, 2002; Oliveira, *et al.*, 2000) y en menor número de muestras naturales (Stoloff y Trucksess, 1978; Garrido Frenich *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Por otro lado, en nuestro país no existen datos sobre los niveles de aflatoxinas en huevos para consumo.

El análisis cromatográfico aplicado a las muestras de huevo requiere realizar una extracción previa y/o pasos de limpieza (“clean up”) para remover las proteínas y los lípidos. En general, la extracción de micotoxinas en huevos se basa en una simple extracción usando acetonitrilo o una mezcla de metanol y agua, lo que causa la precipitación de proteínas. Debido a la cantidad de componentes que se extraen simultáneamente del huevo en el procedimiento de limpieza, a menudo se utilizan columnas de extracción en fase sólida o columnas de inmunoafinidad (Garrido Frenich *et al.*, 2011). desarrollaron una técnica para la extracción de pesticidas, llamada QuEChERS

(acrónimo del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) que, entre otras ventajas, reduce la manipulación de las muestras y requiere poca cantidad de solvente. La técnica se aplicó a una amplia variedad de matrices y contaminantes, tales como pesticidas, residuos de drogas veterinarias o micotoxinas (Koesukwiwat *et al.*, 2010; Whelan *et al.*, 2010; Desmarchelier *et al.*, 2010). El primer reporte de la aplicación de la metodología QuEChERS en huevo pertenece a Garrido Frenich *et al.* (2011).

En el presente capítulo, se evaluará una técnica basada en QuEChERS para la determinación de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ en huevos de granjas de gallinas ponedoras en jaula de establecimientos comerciales de la provincia de Entre Ríos.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Reactivos

Para los ensayos se utilizó un estándar con cuatro aflatoxinas (AF) juntas (Trylogy, TS-108, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania): AFB₁ (2 µg/ml), AFB₂ (0,5 µg/ml), AFG₁ (2 µg/ml) y AFG₂ (0,5 µg/ml). El estándar se reconstituyó en 10 ml de acetonitrilo grado HPLC (Sintorgan S.A., Buenos aires, Argentina).

4.1.2 Protocolo para la extracción de aflatoxinas a partir de clara ó yema de huevo utilizando una metodología basada en QuEChERs.

Para la puesta a punto de la técnica, se utilizaron huevos de supermercado. Se ensayó un tamaño de muestra: 6 g de clara ó yema (Figura 4.1) Cada muestra se pesó en tubos de polipropileno de 50 ml. Luego se agregaron 15 ml de una mezcla de 80:20 de metanol y (Sintorgan S. A.) y agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), adicionada de ácido acético (Sintorgan S. A.) al 1%. Las muestras se agitaron manualmente durante 5 seg, y fueron sonicadas durante 5 min. Luego se agregaron 6 g de sulfato de magnesio anhidro (Sigma-Aldrich) y 1 g de acetato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich). Luego de la adición de las sales, las muestras se agitaron manualmente durante 1 min y luego se sonicaron durante 15 min. Se repitió el mismo procedimiento de agitación y sonicación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 6.000 x g durante 10 min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se lo filtró por membrana de PVDF de 0,22 µm (Millipore, San Pablo, Brasil). Este extracto filtrado fue utilizado para la detección por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Sólo para las muestras de yema de huevo, se realizó una extracción de los lípidos presentes en la muestra, con n-hexano (Sintorgan S. A., grado HPLC). Para ello, luego de la centrifugación a 6.000 x g, se tomaron 3 ml del sobrenadante y se transfirieron a tubos de vidrio de 15 ml. Luego se agregaron 2 ml de n-hexano (Sintorgan S. A., grado HPLC) se agitó manualmente y se centrifugó a 1.048 x g durante 5 min. La fase superior correspondiente a n-hexano se descartó con una pipeta Pasteur. Se repitió el procedimiento una vez más. Finalmente, la fase acuosa, libre de n-hexano, se filtró con membrana de PVDF de 0,22 µm. Este extracto filtrado fue utilizado para la detección por HPLC.

4.1.3 Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó mediante un equipo HPLC (Waters, modelo Alliance 2695) con detector de fluorescencia (Waters 2475) a longitudes de onda de 365 nm y 425-455nm (425 nm para AFB₁ y AFB₂, 455 nm para AFG₁ y AFG₂) para excitación y emisión, respectivamente, luego de la derivatización con bromo en la Kobra cell. Se utilizó una columna XBridge C18 3,5 μm 2,1x 100 mm (Waters, Milford, Massachussets, Estados Unidos). La temperatura de la columna se fijó a 45°C y el flujo fue de 0,25 ml/min. La fase móvil estuvo formada por agua (con la adición de 119 mg de BrK/l + 350 μl de solución 4M de HNO₃/l), metanol y acetonitrilo, mezclados en la proporción de 80:10:10, respectivamente. Los tiempos de retención para AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ fueron 21, 15, 13 y 10 minutos, respectivamente.

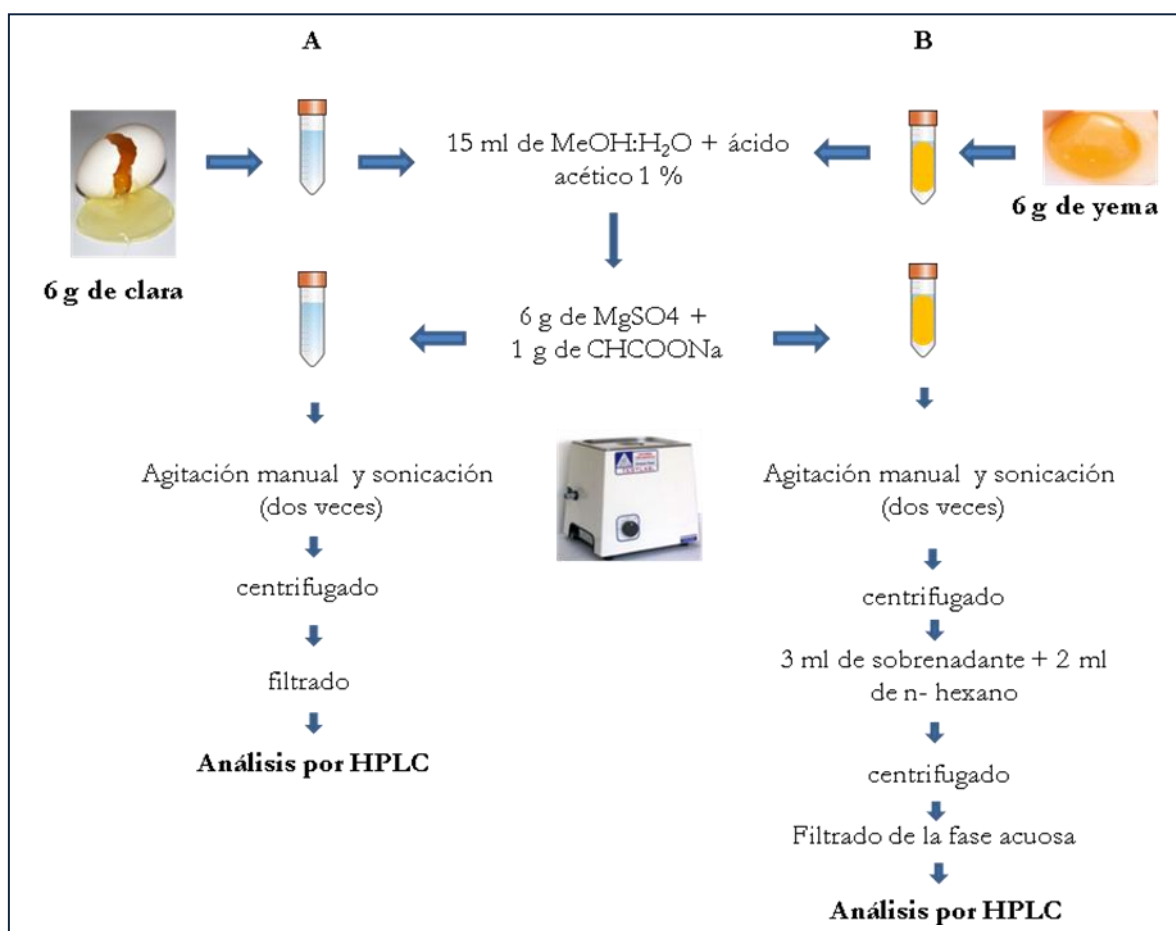


Figura 4.1 Protocolo de extracción para 6 g de clara (A) y yema (B).

4.1.4. Parámetros evaluados de la técnica

Los parámetros cuantitativos de la técnica fueron estudiados por procedimientos de validación con muestras de huevo contaminadas experimentalmente, estudiando la linealidad, exactitud (porcentajes de recuperación), precisión (desviación estándar relativa, DER %), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

La linealidad mide el grado en que la respuesta analítica se ajusta a una función lineal respecto a la concentración del analito (Harris, 2007). La misma se evaluó mediante curvas de calibración en la clara, ajustando los datos experimentales a los valores teóricos a través del coeficiente de correlación al cuadrado (R^2). Para ello, se realizaron fortificaciones de los extractos de clara de huevo (por duplicado) a cinco niveles de concentración de aflatoxinas. Los niveles de estudiados fueron: 0,4; 3,3; 7,0; 23,1; 50,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las AFB₁ y AFG₁. Para las AFB₂ y AFG₂ los niveles fueron: 1,7; 5,8; 12,6; 41,6 y 71,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La exactitud, considerada como la capacidad de dicho método para rendir resultados próximos al valor real o teórico (μ), mide el error sistemático del método. La misma fue expresada en términos de porcentaje (%) de recuperación como la diferencia entre el valor promedio de las mediciones (\bar{X}) respecto al valor teórico ó real (μ) multiplicado por 100:

$$\% \text{ Recuperación} = (\bar{X}/\mu) \times 100$$

La precisión proporciona una medida del error aleatorio o indeterminado de un análisis y fue calculada a través del desvío estándar relativo (DER) o coeficiente de variación. El DER fue expresado como la relación entre la desviación estándar (DE) y el promedio (Prom.) de n mediciones multiplicado por 100, según la siguiente ecuación (Díaz, 2002):

$$\text{DER (\%)} = (\text{DE}/\text{Prom.}) \times 100$$

De acuerdo a lo establecido por la Comunidad Europea en su reglamento 2002/657 (CE, 2002), los valores de precisión en términos de DER (%) no deben ser superiores a los valores calculados por la ecuación de Horwitz, donde C es la fracción de masa expresada como potencia (por ejemplo 1 ppb= 10^{-9}):

$$\text{DER (\%)} \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Sin embargo, para fracciones menores a 100 µg/kg esta ecuación da valores muy altos de DER (%), por lo que la CE recomienda que estos valores deben ser lo más bajo que sea razonablemente posible. Siguiendo la reglamentación antes mencionada (CE, 2002) y de acuerdo a Muñoz Benito (2011), en este trabajo de Tesis, se consideraron valores aceptables aquellos que sean menores a los 2/3 del valor teórico obtenido por la ecuación de Horwitz.

El LB y el LD fue calculado utilizando las ecuaciones propuestas por Armbruster y Pry (2008). El LB fue considerado como la mayor concentración aparente esperada del analito utilizando muestras blancos que no contienen dicho analito y se lo calculó con la siguiente fórmula:

$$LB = \text{media blanco} + 1,645 \times \text{desvío estándar del blanco}$$

El LD se consideró como la menor cantidad de analito significativamente distinta del blanco, es decir, la concentración límite detectable. Para el cálculo se consideró:

$$LD = LB + 1,645 \times \text{desvío estándar de una muestra con una baja concentración del analito}$$

El LC fue considerado como la mínima concentración del analito que se puede cuantificar para un nivel de confianza dado. El LC puede ser equivalente ó más alto al LD.

Para el estudio de la exactitud, precisión, LB, LD y LC, se fortificaron muestras de clara ó yema de huevo con 0,5; 1; 2; 5 y 10 µg/kg para AFB₁ y AFG₁ y con 0,1; 0,2; 0,5; 1,2 y 2,5 µg/kg para AFB₂ y AFG₂. Cada nivel de concentración fue analizado por duplicado en todos los casos.

4.1.5. Análisis de aflatoxinas en muestras de clara y yema de huevos de granjas de gallinas ponedoras.

Se analizaron muestras de clara y yema de huevo correspondientes a 39 galpones de granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos. Los criterios de selección y las características de los galpones se detallan en la sección 4.1.3 y en la Tabla 4.2. De cada galpón, se tomaron dos maples de 30 huevos cada uno. Cada maple fue dividido en 15 huevos (Figura 4.3), de los cuales se homogeneizaron clara y yema por separado. De cada grupo de clara ó yema homogeneizado se conservaron 25 ml a -20°C hasta su posterior análisis mediante la técnica basada en QuEChERS. Luego, las muestras fueron descongeladas y para el procedimiento de extracción de aflatoxinas se pesaron 6 g de muestra. El protocolo de extracción utilizado fue el detallado en el punto 6.1.2 para claras y yemas, con la extracción de lípidos mediante el empleo de n-hexano para estas últimas

(Figura 4.3). En total fueron analizadas 76 muestras de clara (cada una correspondiente a un grupo de 15 claras) y 76 yemas (cada una correspondiente a un grupo de 15 yemas).

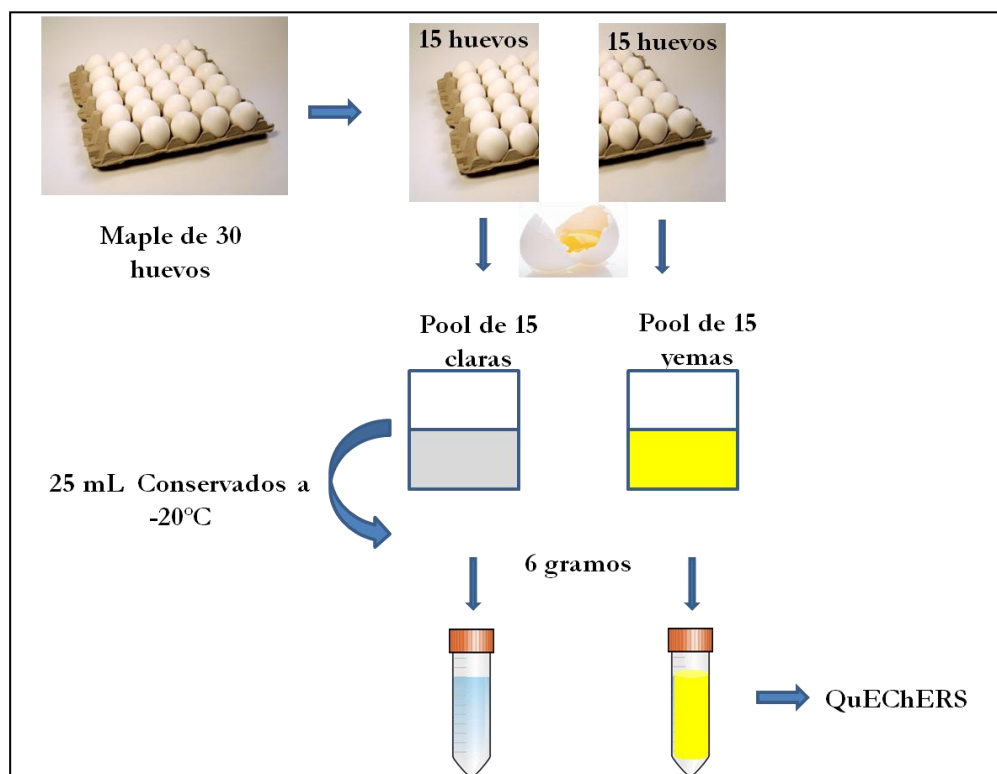


Figura 4.3. Esquema para el procesamiento de las muestras de huevo procedentes de granjas de gallinas ponedoras de Entre Ríos.

4.2. Resultados

La linealidad del método se determinó con las curvas de calibrado en clara de huevo, cuyos R^2 tuvieron valores entre 0,98 y 0,99 para todas las aflatoxinas ensayadas (Tabla 4.1). Los cromatogramas obtenidos para 6 g de muestras de clara de huevo fortificadas con distintos niveles de aflatoxinas se observan en las Figuras 4.4 a 4.7.

Tabla 4.1. Curvas de calibración y coeficientes de correlación en extractos de las muestras de clara de huevo fortificadas con 5 niveles distintos de aflatoxinas, desde 0,4 a 50,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las AFB_1 y AFG_1 y de 1,7 a 71,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las AFB_2 y AFG_2 .

Tipo de aflatoxina	Curva de calibración	R^2
B_1	$Y=2000000X-12028$	0,99
B_2	$Y=3165854,67X-185688,96$	0,98
G_1	$Y=276211X-419706$	0,99
G_2	$Y=461051X-344212$	0,99

Los parámetros de exactitud, precisión, LB, LD y LC para de clara de huevo se muestran en la tabla 4.2. Para AFG₂ no se detectó señal por lo que no pudieron calcularse estos parámetros. Los porcentajes de recuperación variaron según la aflatoxina estudiada entre el 59 y 132%. La AFB₁ tuvo porcentajes de recuperación entre 52 y 88%, mientras que la AFB₂ y la AFG₁ entre 59 y 132%, y entre el 95 y el 99%, respectivamente. Los valores de DER (%) estuvieron entre 0,7 y 21,6. En todos los casos, los valores de DER (%) fueron menores a los 2/3 de la DER (%) Horwitz. Los LB estuvieron entre - 0,01 y 0,02 µg/kg. Los límites de detección fueron 0,15 µg/kg, 0,06 µg/kg y 1,00 µg/kg para AFB₁, AFB₂ y AFG₁, respectivamente. El LC no pudo establecerse para los LD calculados. De todas maneras, se observó que el LC fue mayor al LD para AFG₁, y sería igual ó mayor al LD para AFB₁ y AFB₂.

Tabla 4.2. Valores de recuperación (%R), desvío estándar relativo (DER%), DER calculados como 2/3 de los valores de la ecuación de Horwitz -2/3 DER (%) Horwitz-, límite del blanco (LB), y límite de detección (LD) obtenidos para 6 g de muestras de clara de huevo fortificadas con distintos niveles de aflatoxinas. Los valores de recuperación expresan el promedio de 3 mediciones.

Aflatoxinas	Nivel de fortificación (µg/kg)	%R	DER (%)	2/3 DER % Horwitz	LB (µg/kg)	LD (µg/kg)
B ₁	0,5	77,47	13,26	33,15	- 0,01	0,15
	1	78,84	13,89	29,87		
	2	87,65	9,62	26,91		
	5	80,57	13,58	23,44		
	10	52,21	8,49	21,12		
B ₂	0,1	114,88	21,65	42,24	0,02	0,06
	0,2	115,25	5,91	38,06		
	0,5	131,87	6,20	33,15		
	1,2	117,4	10,47	29,06		
	2,5	58,71	10,50	26,02		
G ₁	0,5 ¹	-	-	-	0,02	1,00
	1 ¹	-	-	-		
	2	94,63	3,06	26,91		
	5	98,67	16,49	23,44		
	10	96,95	0,74	21,12		

¹ La AFG₁ no pudo ser detectada en concentraciones de 0,5 y 1 µg/kg.

Los cromatogramas obtenidos para 6 g de muestras de yema de huevo fortificadas con distintos niveles de aflatoxinas se observan en las Figuras 4.8 a 4.11. Los parámetros DER (%), 2/3 DER (%) Horwitz, LB y LD se observan en la Tabla 4.3. Los valores de

DER (%) estuvieron entre 3,4 y 34,5. Todos los valores DER (%) fueron menores a los calculados por la ecuación de Horwitz, excepto para la concentración de 2 µg/kg para AFG₁. Los valores de LB estuvieron entre -0,20 a 0,02. Los LD límites de detección fueron 0,13 µg/kg, 0,12 µg/kg y 0,45 µg/kg para AFB₁, AFB₂ y AFG₁, respectivamente. El LC no pudo establecerse para los LD calculados. De todas maneras, se observó que el LC fue igual al LD para AFB₂, mayor al LD para AFG₁ y sería igual ó mayor al LD para AFB₁. Al igual que en la muestras de 6 g de claras, no hubo señal detectable para AFG₂.

Para la determinación del LB y LD tanto en clara como en yema se utilizaron las curvas de calibración descriptas en la Tabla 6.4 y Figuras 6.12 a 6.17, obtenidas fortificando clara ó yema de huevo con 5 niveles distintos de aflatoxinas, desde 0,5 a 10 µg/kg para las AFB₁ y AFG₁ y de 0,1 a 2,5 µg/kg para las para las AFB₂. El R² fue mayor a 0,97.

Tabla 4.3. Desvío estándar relativo (DER%), DER calculados como 2/3 de los valores de la ecuación de Horwitz -2/3 DER (%) Horwitz-, límite del blanco (LB) y límite de detección (LD) obtenidos para 6 g de muestras de yema de huevo fortificadas con distintos niveles de aflatoxinas.

Aflatoxinas	Nivel de fortificación (µg/kg)	DER (%)	2/3 DER (%) Horwitz	LB (µg/kg)	LD (µg/kg)
B ₁	0,5	6,80	33,15	-0,20	0,13
	1	13,28	29,87		
	2	5,82	26,91		
	5	3,36	23,44		
	10	20,33	21,12		
B ₂	0,1	12,40	42,24	0,02	0,12
	0,2	7,61	38,06		
	0,5	14,36	33,15		
	1,2	21,60	29,06		
	2,5	9,51	26,02		
G ₁	0,5 ¹	-	-	0,00	0,45
	1	22,03	29,87		
	2	34,46	26,91		
	5	5,30	23,44		
	10 ²	NR*	-		

¹La AFG₁ no pudo ser detectada en concentraciones de 0,5 µg/kg.

² NR: no realizado.

Tabla 4.4. Curvas de calibración y coeficientes de correlación en las muestras de clara ó yema de huevo fortificadas con 5 niveles distintos de aflatoxinas, desde 0,5 a 10 µg/kg para las AFB₁ y AFG₁ y de 0,1 a 2,5 µg/kg para las para las AFB₂. La ecuación se tomó para el cálculo del límite del blanco y límite de detección.

Tipo de aflatoxina	Clara		Yema	
	Curva de calibración	R ²	Curva de calibración	R ²
B ₁	Y= 2000000X + 38951	0,998	Y= 1000000X + 224517	0,983
B ₂	Y= 4000000X - 69312	0,996	Y= 3000000X -62170	0,977
G ₁	Y= 787212X - 737577	0,975	Y= 361089X -3170,4	0,989

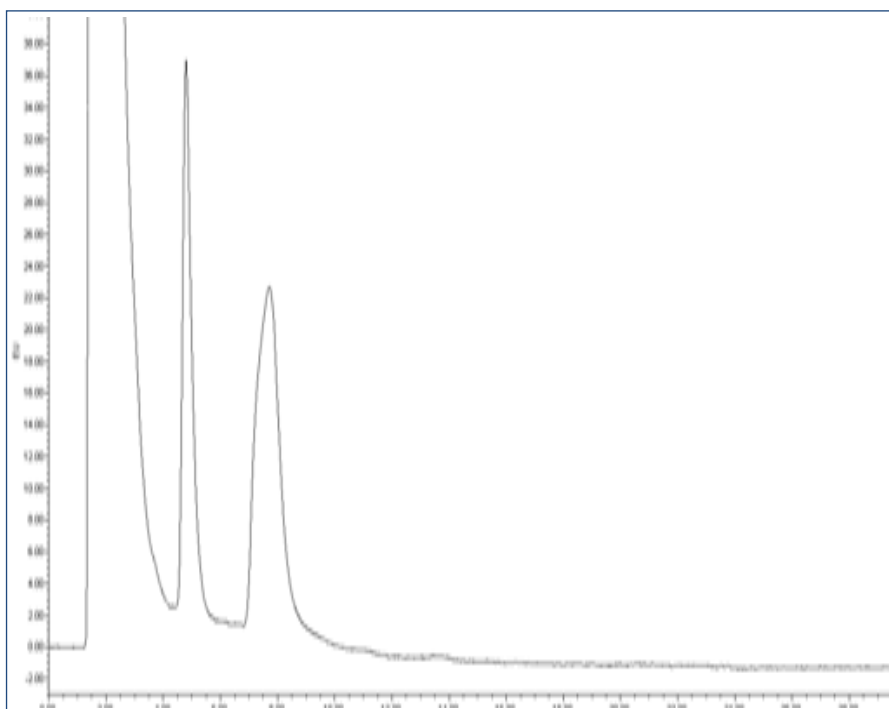


Figura 4.4. Cromatograma de 6g de muestra de clara sin fortificar.

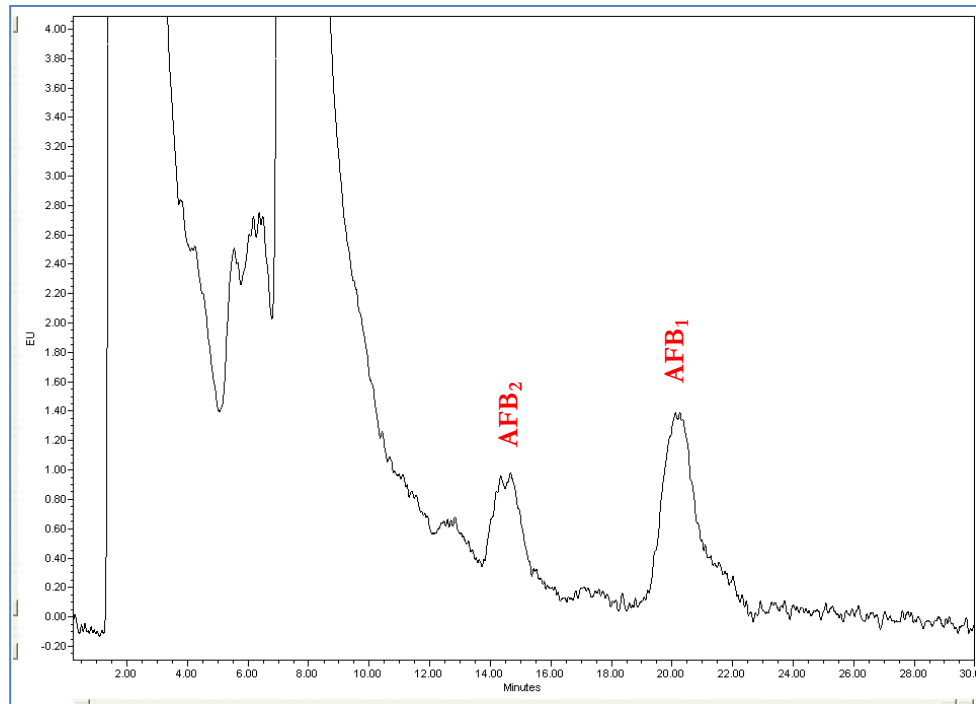


Figura 4.5. Cromatograma de muestra de clara fortificada con 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₂ y 0,5 de AFG₁ $\mu\text{g}/\text{kg}$.

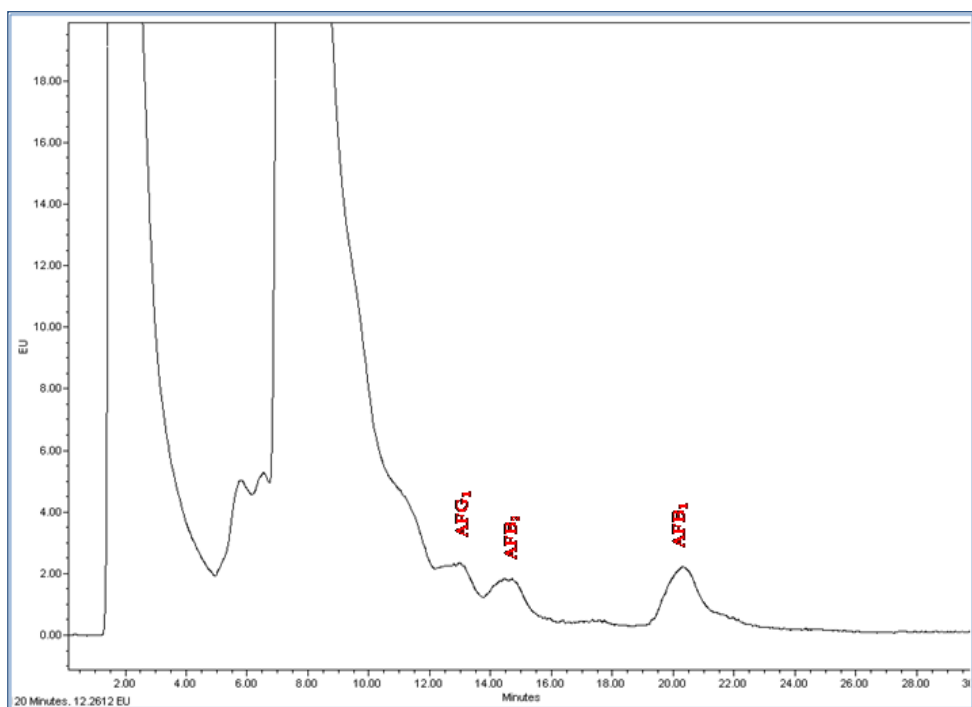


Figura 4.6. Cromatograma de muestra de clara fortificada con 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁, 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₂ y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFG₁.

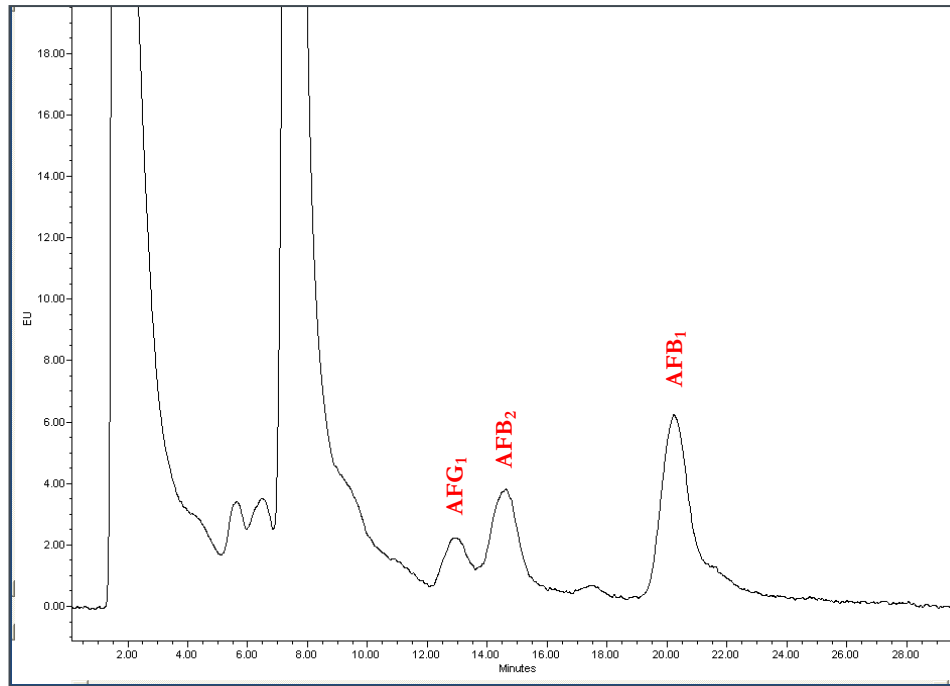


Figura 4.7. Cromatograma de muestra de clara fortificada con 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₂ y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFG₁

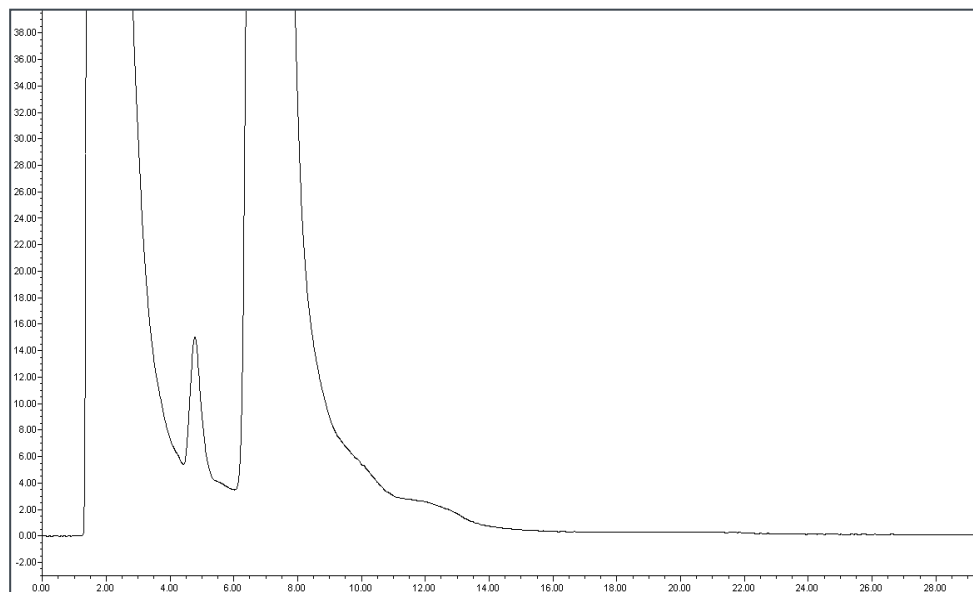


Figura 4.8. Cromatograma de 6g muestra de yema sin fortificar.

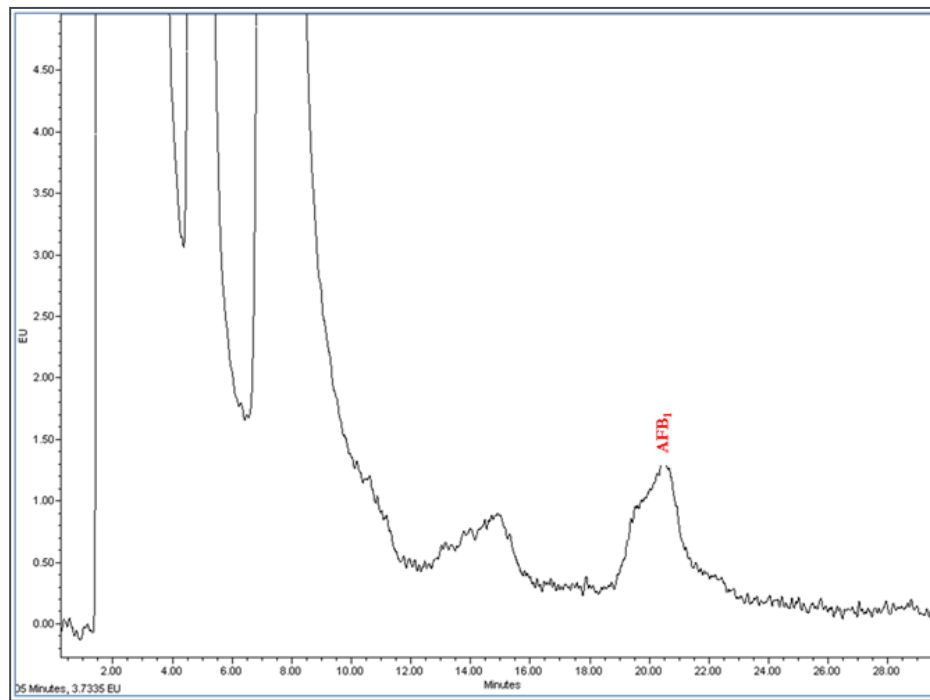


Figura 4.9. Cromatograma de muestra de yema fortificada con 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 , 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_2 y 0,5 de AFG_1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

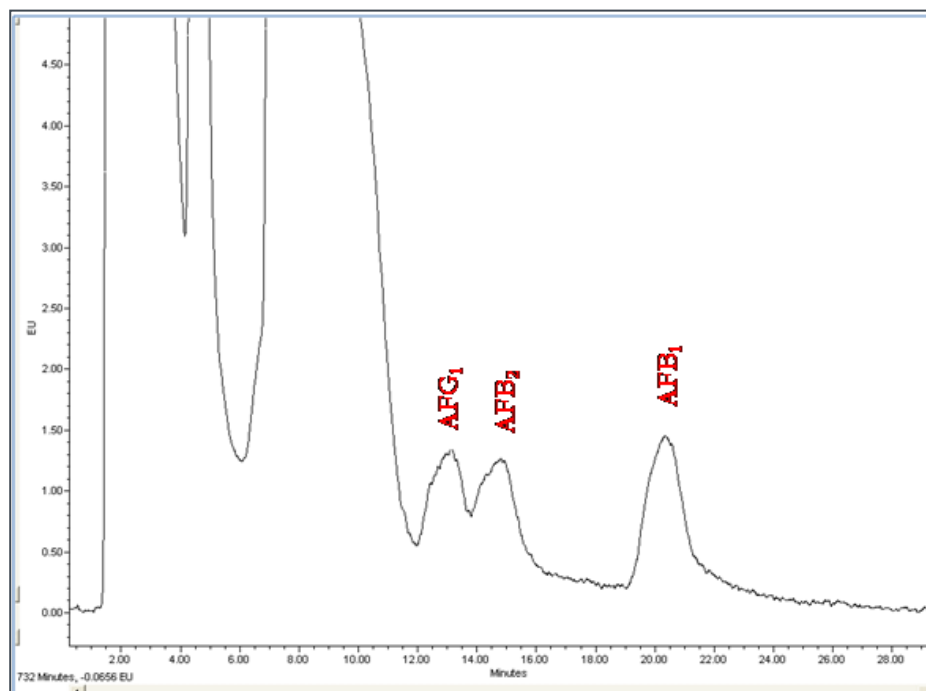


Figura 4.10. Cromatograma de muestra de yema fortificada con 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 , 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_2 y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFG_1

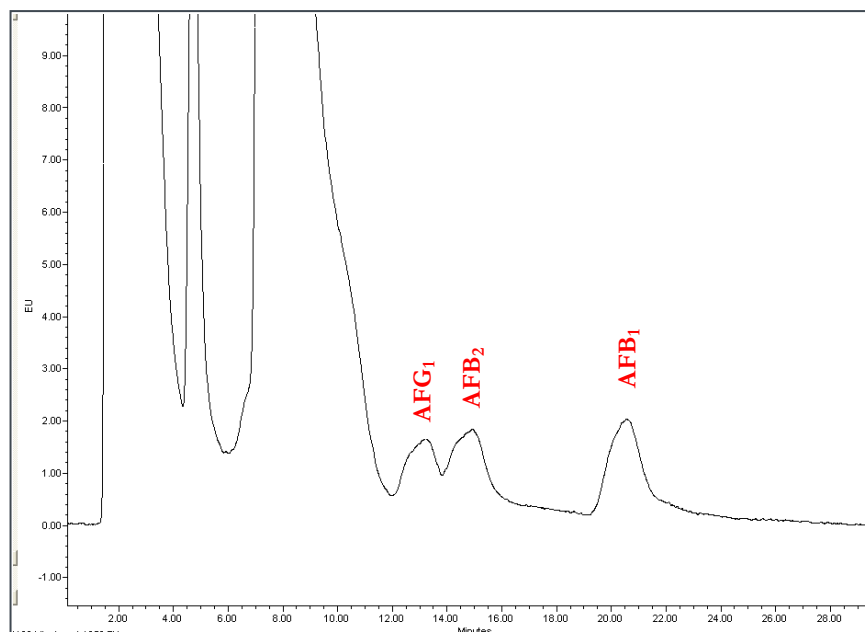


Figura 4.11. Cromatograma de muestra de yema fortificada con 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₂ y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFG₁

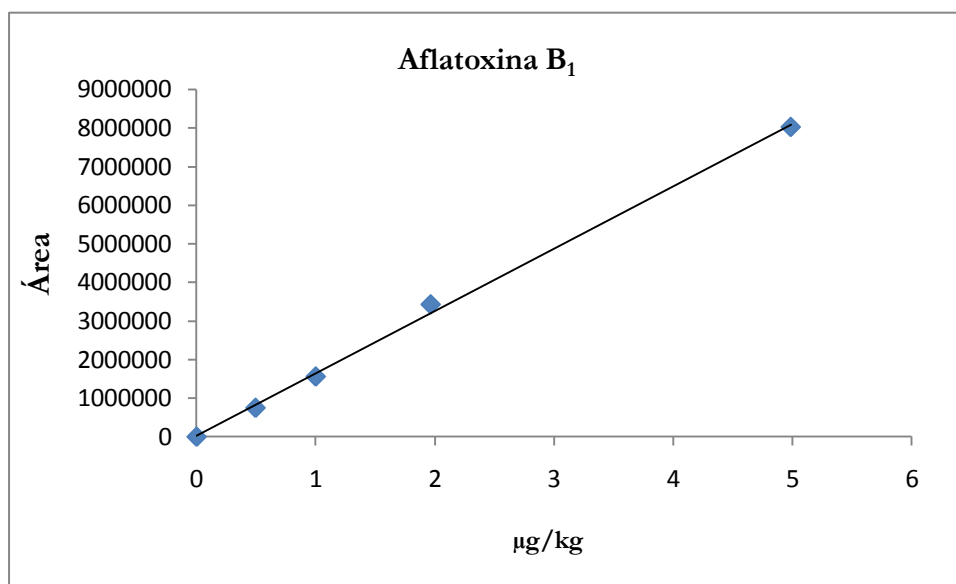


Figura 4.12. Curva de calibración para aflatoxina B₁ en clara de huevo

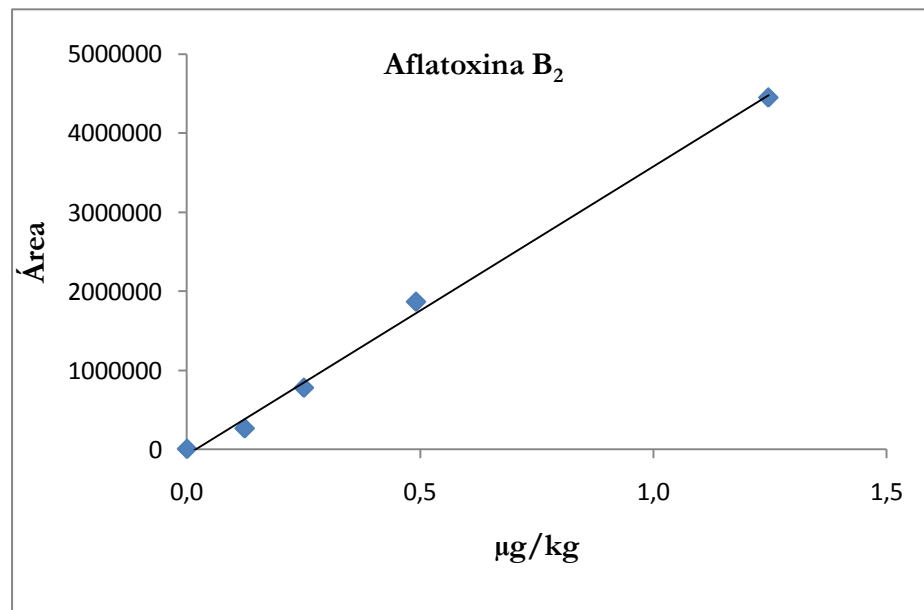


Figura 4.13. Curva de calibración para aflatoxina B₂ en clara de huevo

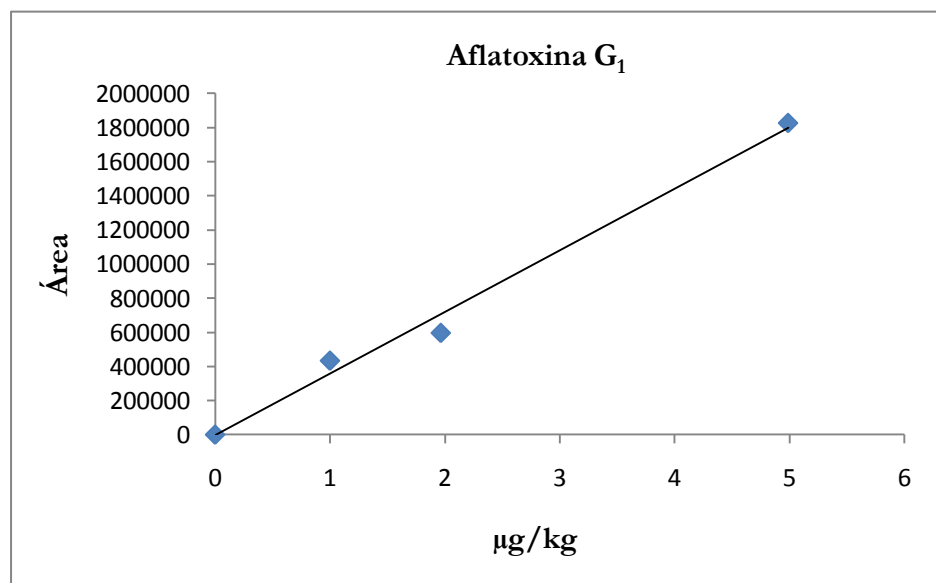


Figura 4.14. Curva de calibración para aflatoxina G₁ en clara de huevo.

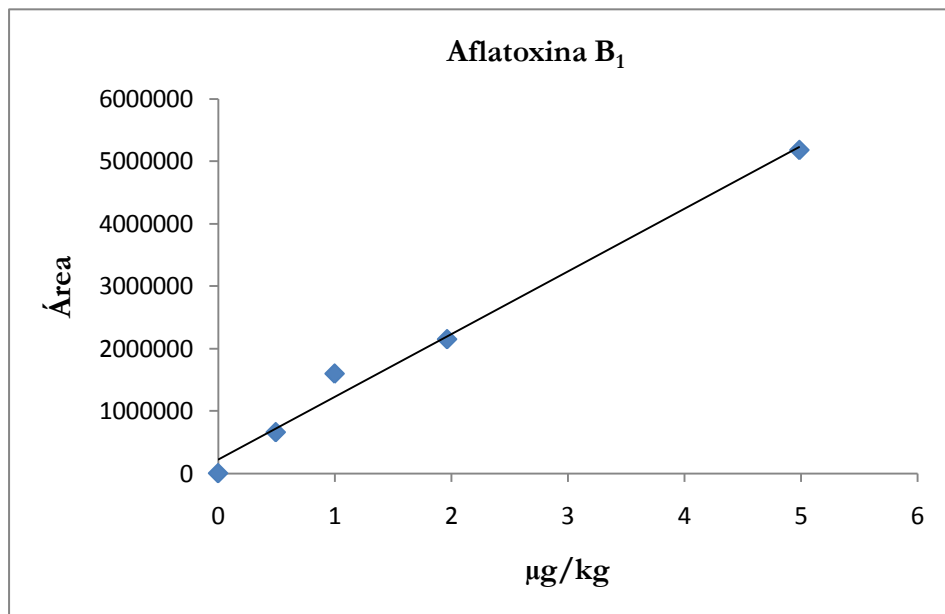


Figura 4.15. Curva de calibración para aflatoxina B₁ en yema de huevo.

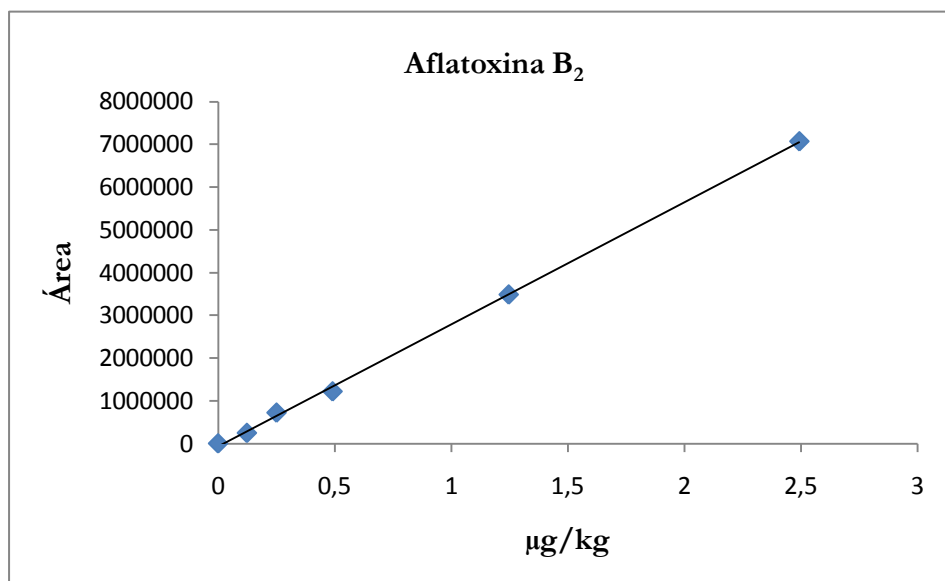


Figura 4.16. Curva de calibración para aflatoxina G₁ en yema de huevo.

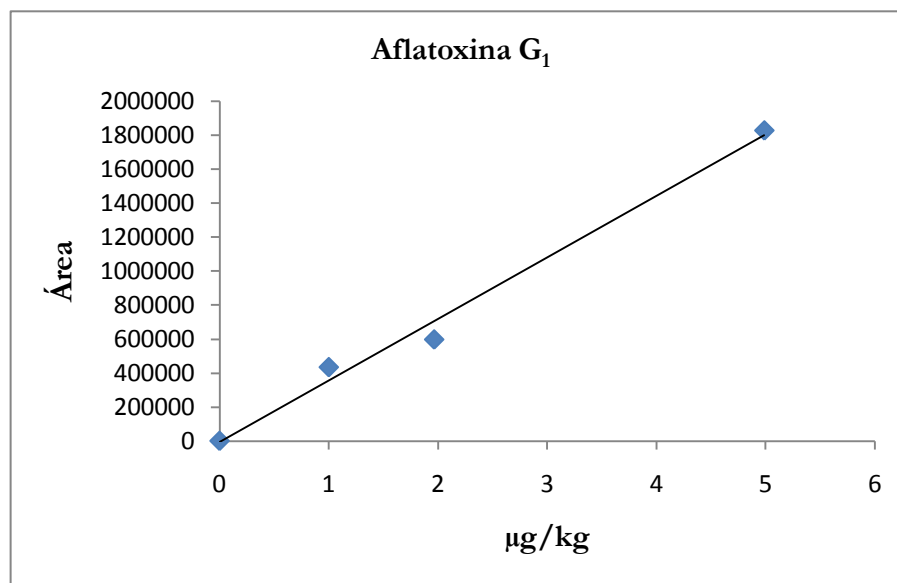


Figura 4.17. Curva de calibración para aflatoxina G₁ en yema de huevo.

El método desarrollado para 6 g de muestra se aplicó a huevos (clara y yema por separado) procedentes de las granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos. En ninguna de estas muestras se detectó AFB₁, AFB₂ ó AFG₁. Los cromatogramas mostrando la corrida de las muestras de clara ó yema de las granjas se observa en la figuras 4.18 y 4.19, respectivamente.

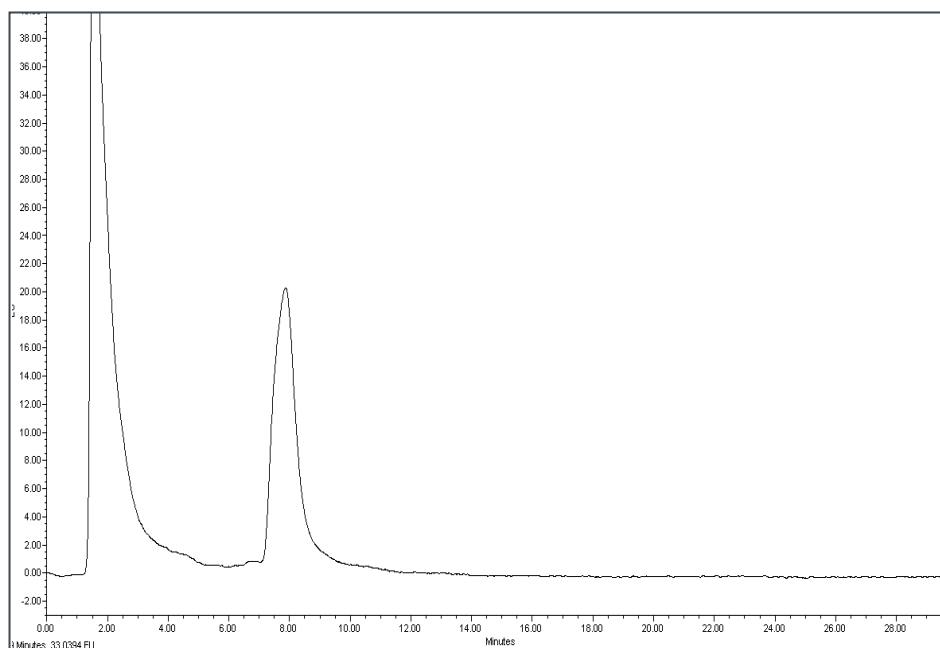


Figura 4.18. Cromatograma de muestra de clara de huevo de granja de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

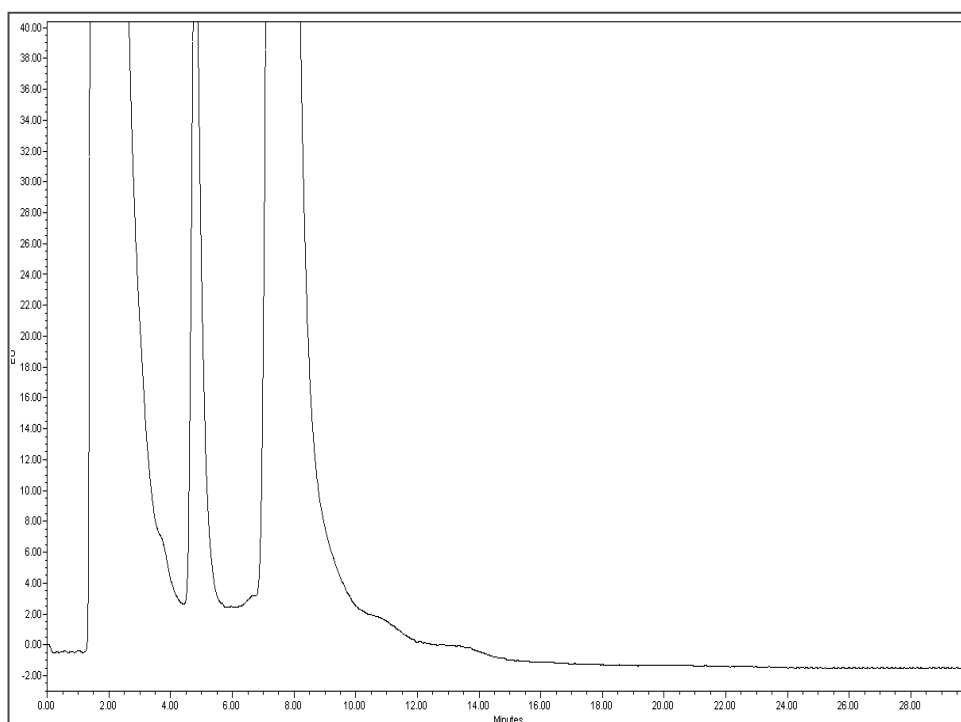


Figura 4.19. Cromatograma de una muestra de yema de huevo de granja de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

4.3. Discusión

En el presente capítulo, se siguió en clara de huevo el mismo protocolo de extracción de aflatoxinas propuesto por Garrido Frenich *et al.* (2011) para huevo entero. Por otro lado, Scussel (2003) reportó que la presencia de altos contenidos de lípidos y proteínas es el principal problema en la extracción de las toxinas en huevo, ya que se produce emulsificación de las muestras. En este trabajo de Tesis, durante un estudio preliminar en yema se observó la presencia de lípidos en los sobrenadantes que se utilizarían para la inyección en el HPLC. Por tal motivo, se decidió evaluar la técnica de extracción propuesta por Garrido Frenich *et al.* (2011) con la adición de n-hexano a la yema. Así también, el aumento de la cantidad de muestra (antes del paso de filtrado) permitió obtener un volumen adecuado para realizar la filtración final antes de la inoculación en el HPLC.

Garrido Frenich *et al.* (2011) informaron un efecto de la matriz huevo entero sobre la detección de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Debido a ello, estos autores recomiendan hacer la curva de calibración sobre la matriz para compensar este efecto. Considerando esta sugerencia, en este trabajo de Tesis se realizó la curva de calibración utilizando bajas concentraciones del analito y fortificando muestras blancos de clara ó yema.

Garrido Frenich *et al.* (2011) encontraron LD y LC de 0,5 µg/kg y 1 µg/kg para AFB₁, AFB₂ y AFG₁, respectivamente, mientras que para AFG₂ reportaron valores de LD y LC de 1,0 y 2,0 µg/kg, respectivamente, en 3 g de muestra analizados. En dicho trabajo se estudió la contaminación del contenido de huevo entero (clara y yema juntos) y los analitos fueron detectados mediante cromatografía líquida de ultra-alta presión (UPLC por sus siglas en inglés, ultra-high-pressure liquid chromatography) acoplada a espectrometría de masa. En el presente estudio, la misma técnica se evaluó en 6 g clara y yema por separado, mediante HPLC y detección por fluorescencia con derivatización post columna, encontrándose valores menores en los LD teóricos para AFB₁, AFB₂, y AFG₁, mientras que no pudo calcularse el LD de AFG₂, dado que el pico cromatográfico de esa toxina no pudo ser resuelto en concentraciones entre 0,1 a 2,5 µg/kg. Para calcular el LD, Garrido Frenich *et al.* (2011) utilizaron el criterio de relación señal: ruido de 3. Bajo ese mismo criterio, en el trabajo de esta Tesis las relaciones señal: ruido para AFB₁ y AFB₂ en clara y yema fueron de 135 y 103, y 422 y 199, respectivamente, es decir, muy por encima del valor 3 tomado en el trabajo nombrado anteriormente con el mismo nivel de fortificación. Aunque no se calculó directamente el LC en este trabajo de Tesis, los niveles de fortificación de las muestras utilizados y la detección en los cromatogramas indican que los LC para AFB₁ y AFB₂ fueron menores que lo informado por Garrido Frenich *et al.* (2011), quienes utilizaron para calcular este parámetro la relación señal: ruido igual a 10.

Por su parte, Trucksses y Stoloff (1983) desarrollaron una metodología para la detección de AFB₁, AFM₁ y aflatoxicol mediante cromatografía en capa delgada (AFB₁, AFM₁) y HPLC (aflatoxicol). Estos autores encontraron valores de recuperación entre 75 y 86% para AFB₁ en huevo entero en concentraciones de 0,1 y 0,05 µg/kg, las cuales son menores a las estudiadas en este trabajo de Tesis para dicha aflatoxina. Por otro lado, Capriotti *et al.* (2012) evaluaron la metodología QChERS para el análisis simultáneo de drogas veterinarias y micotoxinas en huevos de gallinas de postura utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Estos autores no informaron LD o LC para AFB₁ reportando solamente valores de recuperación de 76, 79 y 83% para concentraciones de 5, 10 y 20 µg/kg, lo cual fue mejor que lo obtenido en este trabajo de Tesis en el nivel de 10 µg/kg.

El Reglamento de la Comisión Europea (CE) N° 401/2006 establece los criterios de funcionamiento para la determinación del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, en los casos en los que no se exija ningún método específico. En esta reglamentación, se proponen porcentajes de recuperación situados entre 70 y 110% para intervalos de concentración de 1-10 µg/kg y entre 50 a 120% para concentraciones

menores a 1,0 µg/kg. La técnica estudiada para clara de huevo cumple estos requisitos para AFB₁ (excepto para 10 µg/kg) y AFB₂ (con excepción en 0,5 µg/kg).

Con relación a las muestras de clara y yema de huevo obtenidas en granjas de gallinas ponedoras comerciales, considerando los LC para AFB₁, AFB₂ y AFG₁, no se detectaron estas aflatoxinas en ninguna de las muestras examinadas. Stoloff y Trucksess (1978) realizaron un estudio de aflatoxinas en huevos procedentes de 35 establecimientos localizados en el sur de los Estados Unidos, encontrando que sólo una muestra de 112 analizadas fue positiva a AFB₁. La misma se encontró en la clara y tuvo un nivel de 0,06 µg/kg. Garrido Frenich *et al.* (2011) procesaron 7 muestras (10 huevos cada una) de supermercado para el análisis de distintas aflatoxinas, encontrando niveles traza (<LC) en 1 de las muestras para AFB₁. Chen *et al.* (2012) analizaron 3 muestras de huevo, encontrando en una de ellas una concentración de AFB₁ de 0,73 µg/kg. Por su parte, Capriotti *et al.* (2012) no detectaron AFB₁ en 27 muestras de huevo de gallinas analizadas.

Para evaluar el pasaje de dichas toxinas al huevo se han realizado distintos estudios experimentales en gallinas ponedoras alimentadas con raciones contaminadas con diferentes niveles de aflatoxinas (Jacobson y Wiseman, 1974; Trucksess *et al.*, 1983; Micco *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2000; Bintvihok *et al.*, 2002; Zaghini *et al.*, 2005; Salwa y Anwer, 2009). La tasa de pasaje de AFB₁ desde el alimento al huevo es variable, de 2000:1 a 40.000:1, dependiendo tanto de la concentración de AFB₁ en la dieta como del período de alimentación con ración contaminada con esta toxina. De acuerdo a los LD calculados en este trabajo de Tesis, el nivel mínimo de AFB₁ que debería tener un alimento (para las aves) para que esta aflatoxina pueda ser detectada en clara y yema de huevos estarían entre 300 a 6000 µg/kg y 260 y 5.200 µg/kg en clara y yema, respectivamente. Distintos estudios de AFB₁ en alimentos de aves realizados en Argentina encuentran niveles de contaminación natural de esta toxina en un rango de 10 a 1.620 µg/kg (Dalcero *et al.*, 1997, 1998, Varsavsky *et al.*, 1979). Ciertas concentraciones pueden estar en el rango a los que, teóricamente por la tasa de pasaje, podrían ser detectados con la técnica utilizada en este trabajo de Tesis. Por ello, aunque en el presente estudio se desconoce si los alimentos que consumieron estas gallinas pudieran haber estado contaminados con aflatoxinas, de existir tal contaminación, probablemente ocurrió en niveles que, luego de la tasa de pasaje, no pudieron ser detectados en huevo con la técnica empleada.

4.4. Conclusiones

- ✓ La metodología propuesta en este trabajo de Tesis para el análisis de aflatoxinas en claras y yemas de huevo presenta buenos parámetros de validación y permite la detección de AFB₁ y AFB₂ por debajo de 0,5 µg/kg. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder determinar la presencia de AFG₂ en ambas matrices.
- ✓ La técnica utilizada permite la detección de AFB₁ en clara o yema en algunos niveles de contaminación natural del alimento de las gallinas de postura.
- ✓ Los huevos provenientes de las granjas muestreadas en la provincia de Entre Ríos no representaron ningún riesgo para el consumo humano, ya que en todos ellos no se encontraron concentraciones detectables de AFB₁, AFB₂ o AFG₁ dentro de la metodología empleada.

Capítulo 5

Identificación de factores de riesgo para *Salmonella* sp. en gallinas ponedoras y aflatoxinas en huevos de granjas avícolas de Entre Ríos.

Se define el “riesgo” como la probabilidad que un evento ocurra (Burt, 2001). El riesgo en epidemiología equivale a la probabilidad de ocurrencia de una patología en una población determinada (de Almeida Filho *et al.*, 2009). La exposición a un factor de riesgo significa que un individuo ha estado afectado por el factor, antes de presentar la enfermedad (Pfeiffer, 2010).

En términos generales, cada granja tiene su propio perfil de riesgos para la introducción de patógenos, desarrollo de la enfermedad y dispersión del patógeno hacia otras granjas. Este perfil de riesgos está determinado por una compleja interacción entre los niveles de infección en un área determinada, las medidas implementadas en las granjas para prevenir la enfermedad y otros factores que incluyen la densidad de granjas en la zona, los vínculos entre ellas y con el mercado (Sims, 2007).

Los riesgos sanitarios en la producción avícola pueden disminuirse aplicando distintas medidas de manejo, instauradas conjuntamente con un plan de bioseguridad. La bioseguridad es una forma de reducir la introducción y propagación de enfermedades; es una herramienta que debe ser implementada y practicada en todos los niveles dentro de las granjas avícolas (Gernath, 2004).

En el presente capítulo se determinarán los factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* y/o aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos.

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Selección de las unidades muestrales

La estimación de los factores de riesgo se realizó en las granjas seleccionadas y muestreadas de acuerdo a los criterios descritos en los puntos 3.1.1 y 3.1.2.

5.1.2 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). Las preguntas fueron cerradas (dicotómicas o de opción múltiple). El cuestionario fue dividido en secciones referentes a datos de la identificación de la granja, plan de vacunación de los animales, conocimiento de reglamentaciones avícolas, medidas de bioseguridad aplicadas, antecedentes de enfermedades, características del alimento, abastecimiento de agua, destino de los huevos y tipo y manejo de maple. Otra parte del cuestionario se refirió a la recolección de los datos del galpón muestreado (Tabla 5.1).

Las preguntas se realizaron personalmente el día del muestreo, efectuándolas al propietario de la granja, o en su ausencia, al encargado del establecimiento. En cada visita, se entregó un certificado de agradecimiento por la colaboración de este estudio y en el que se aseguraba la absoluta confidencialidad de los datos (Figura 5.1).

5.1.2. Procesado de los datos y análisis estadístico

Las respuestas obtenidas a partir de la encuesta fueron codificadas en una planilla de Excel (Microsoft). Para cuantificar el riesgo asociado con la presencia de *Salmonella* y/o aflatoxinas en las granjas de gallinas ponedoras que se examinaron, se realizó un análisis estadístico de dos etapas, tomando como unidad de estudio a los galpones muestreados. 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* ó presencia-ausencia de aflatoxinas (variable dependiente) 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.

Tabla 5.1. Encuesta realizada en las 30 granjas de gallinas de postura muestreadas en la provincia de Entre Ríos.

Encuesta de granjas de gallinas ponedoras		Código:	
Identificación de la granja			
Fecha de muestreo:			
Empresa:	Dirección:		
Teléfono:	Correo electrónico:		
Localidad/Departamento			
Nº de habilitación			
Profesional responsable			
Tipo de explotación			
Número de galpones:	Identificación de los galpones (Nº, nombre etc)		
Capacidad instalada			
Categoría SENASA:	A	B	C
Plan de vacunación:			
Conocimiento de reglamentación:			
¿Conoce la reglamentación 542/2010?	Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>
¿Conoce la reglamentación de distancias mínimas aves-cerdos?	Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>
Bioseguridad			
Cerco Perimetral completo y puerta de entrada	Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>
Cumple distancias de separación con granjas vecinas (1000 m)	Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>
Posee equipo de desinfección de vehículos, equipos, jaulas e implementos?	Si <input type="checkbox"/>		
No <input type="checkbox"/>	¿Funciona?		Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Posee equipamiento para el ingreso de personas (cambio de ropa y calzado; botas de plástico, overol etc.)			
		No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Existencia de otras especies en el predio			
		No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Sistema de eliminación de cadáveres			
Incineración:		cerrada	abierta
Fosa :		cerrada	abierta
Otro sistema (especifique):			
Control de moscas	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Producto: Frecuencia de tratamiento:
Control de roedores	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Producto: Frecuencia de tratamiento:
Lleva un registro (libro foliado, manual etc.) de prácticas con fines de higiene y bioseguridad? No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>			
Antecedentes de enfermedad	salmonelosis	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/> Tratamiento:
	micotoxicosis	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/> Tratamiento:
Otras:			
Alimento			
Origen:	elaboración propia <input type="checkbox"/>		compra a terceros <input type="checkbox"/>
Presentación:	harina <input type="checkbox"/>		pellet <input type="checkbox"/>
Desinfección:	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Producto:
Secuestrante de micotoxinas	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Producto:
Acidificantes	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Producto:
Composición de soja <input type="checkbox"/>	Maiz <input type="checkbox"/>	Harina de pescado <input type="checkbox"/>	Poroto de soja <input type="checkbox"/> Harina
	Sorgo <input type="checkbox"/>	Harina de pluma <input type="checkbox"/>	Harina de carne <input type="checkbox"/> Otros

Tabla 5.1. Continuación

Encuesta de granjas de gallinas ponedoras		Código:	
Abastecimiento de agua			
Tipo (pozo, agua de red etc):	Desinfección: No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Producto:
¿Realiza análisis de potabilidad de agua?	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Frecuencia:
Huevos			
Destino:	industrialización <input type="checkbox"/>	consumo <input type="checkbox"/>	
Tipo de maple:	plástico reutiliza	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
	cartón reutiliza	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Otros (especifique)			
Lavado y desinfección:	maple	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
	Huevo	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Observaciones:			
Galpón muestreado			
Tamaño	Edad de las aves:		
Línea genética	porcentaje de postura:		
Color:	medicación:		
Cantidad de aves	vacunas:		
Nº de aves por jaula:	Tipo de comedero:		
Nº de tolvas:	Tipo de bebedero:		
Espacio que rodea al galpón desmalezado, limpio y libre de desperdicios		No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Lateral del galpón con tejido de malla fina u otro material		No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Cinta transportadora de guano		No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Observaciones			



Figura 5.1. Certificado entregado a cada una de las 30 granjas luego de la visita.

Las variables cuantitativas “edad de las gallinas” y “número de animales por galpón” fueron categorizadas. Para la “edad”, la variable fue dividida entre las categorías “≥ de 12 meses” y “<de 12 meses”. La variable “cantidad de animales” fue dividida en base al promedio de aves entre todos los galpones visitados. En el caso de la variable “reutilización del maple”, no pudo analizarse su significancia frente al aislamiento de *Salmonella*, ya que los galpones que no reutilizan el maple fueron todos negativos al aislamiento, originando un

valor nulo en la tabla de contingencia. En estos casos no es posible aplicar el test de χ^2 o el test de Fisher. Por lo tanto, esa variable no fue considerada para el análisis multivariado. Por otro lado, las variables cualitativas con muchos niveles se categorizaron en dos niveles.

Una vez ordenados los datos se procedió al análisis mediante χ^2 ó 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.

5.2 Resultados

Los resultados del cuestionario se describen en las Tablas 5.2 y 5.3. Sólo el 16,7 % y 13% de las granjas encuestadas conocían la reglamentación nacional vigente acerca de bioseguridad en los establecimientos de producción avícola y la reglamentación sobre distancias mínimas aves-cerdos, respectivamente. La mayoría de los establecimientos visitados presentaban el cerco perimetral completo y puerta de entrada. De las 30 granjas, 20 de ellas cumplían con la distancia de 1.000 m entre las granjas vecinas. Diecinueve granjas no presentaron equipos de desinfección de vehículos, jaulas e implementos. En la mayoría de las 11 restantes, estos equipos eran funcionales. Nueve de las 30 granjas tenían equipamiento para el ingreso de personas. El sistema de eliminación de cadáveres fue variado: un 26 % lo hacían en forma de fosa cerrada, seguido de incineración cerrada, fosa abierta, incineración abierta y composta. Casi todos los establecimientos realizaban control de moscas y roedores. Sólo un 10% llevaba un registro de sus prácticas de higiene y bioseguridad. En cuanto a enfermedades previas, un 6,7% mencionaron antecedentes de salmonelosis y/o micotoxicosis.

El 63,3 % de las granjas elaboraba su propio alimento y el porcentaje restante realizaba la compra a terceros. En general, la presentación del mismo fue en forma de

harina y una menor proporción en forma de pellet. Todas las granjas tuvieron agua de pozo y un 16% realizaba análisis de potabilidad (Tabla 5.3).

En la mayoría de las granjas la producción de huevos se destinaba tanto a la industrialización como al consumo (76,7%). La mayoría de los establecimientos utilizaba indistintamente maples de cartón o plástico. Existieron 8 establecimientos que sólo utilizaban maples de cartón y 5 de esas granjas reutilizaban este tipo de envase sin ningún tratamiento previo de desinfección. Dos granjas sólo utilizaban maples de plástico para el exclusivo envío de los huevos a la industria y estos maples sólo retornaban a la granja una vez que habían sido desinfectados por la industria (Tabla 5.3).

Por otro lado, 22 (73,3%) granjas tuvieron los laterales limpios y libres de desperdicios. De éstas, 12 granjas fueron positivas al aislamiento de *Salmonella* sp.

En la tabla 5.4 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* sp. con un valor de $P < 0,15$ en los galpones fueron: cantidad de aves en el galpón (<10.000 , >10.000), número de aves por jaula, categorización de los departamentos (Paraná/ resto de los departamentos), origen del alimento (elaboración propia/compra a terceros), y cinta para guano. En la Tabla 5.5 se detallan los resultados del análisis multivariado de regresión logística. De acuerdo con estos resultados, la categorización por departamentos resultó significativa, con un valor de P de 0,018. La razón de probabilidades (OR) para esta categorización fue de 11,19. Por lo tanto, los galpones de las granjas que se encuentran en Paraná tienen 11,19 veces más riesgo de presencia de *Salmonella*, que aquellos que se encuentran en el resto de los departamentos. Por otro lado, aunque la variable “cantidad de aves” no fue significativa, su valor de P estuvo cercano al límite de significancia 0,05 y el OR para las granjas con más de 10.000 aves, fue 11,02 veces más alto que en granjas con menos de 10.000 aves por galpón. Las variables origen del alimento, número de aves por jaula y cinta para guano, quedaron fuera del modelo de regresión logística ($P > 0,05$).

Al evaluar la existencia de asociación entre los factores de riesgo y las variables que quedaron fuera del modelo, se encontró que el número de aves/jaula y la presencia de cinta para guano estaban asociadas a la cantidad de aves, con valores de $p=0,001$ y $0,002$, respectivamente. Por otro lado, el origen del alimento no presentó asociación con ninguno de las otras variables.

Tabla 5.2. Resultados generales de la encuesta realizada en las 30 granjas muestreadas relativo al conocimiento de las reglamentaciones existentes, aspectos de bioseguridad y antecedentes de enfermedad. Se indica el número de granjas con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario para granjas positivas y negativas al aislamiento de *Salmonella* sp.

Aspectos de la encuesta	N° de granjas (% sobre total de granjas) (n=30)	Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	
		N° Granjas Positivas (% sobre total de granjas) (n=18)	N° Granjas negativas (% sobre total de granjas) (n=12)
Conocimiento de la reglamentación 542/2010	5 (16,7)	3 (10,0)	2 (6,7)
Conocimiento de la reglamentación sobre distancias mínimas aves-cerdos	13 (43,3)	9 (30,0)	4 (13,3)
Cerco perimetral completo y puerta de entrada	27 (90,0)	17 (56,7)	10 (33,3)
Cumple distancias de separación con granjas vecinas	20 (66,7)	11 (36,7)	9 (30,0)
Posee equipos de desinfección (vehículos, equipos, jaulas e implementos)	11 (36,7)	6 (20,0)	5 (16,7)
Funcionan los equipos de desinfección	10 (33,3)	6 (20,0)	4 (13,3)
Posee equipamiento para ingreso de personas	9 (30,0)	7 (23,3)	2 (6,7)
Existencia de otras especies en el predio (bovino, oveja, cerdos, perros y gatos)	19 (63,3)	10 (33,3)	9 (30,0)
Sistema de eliminación de cadáveres			
composta	3 (10,0)	1 (3,3)	2 (6,7)
incineración abierta	3 (10,0)	2 (6,7)	1 (3,3)
incineración cerrada	7 (23,3)	5 (16,7)	2 (6,7)
fosa cerrada	8 (26,7)	6 (20,0)	2 (6,7)
fosa abierta	4 (13,3)	2 (6,7)	2 (6,7)
otro sistema	5 (16,7)	2 (6,7)	3 (10,0)
Controla moscas	25 (83,3)	15 (50,0)	10 (33,3)
Controla roedores	29 (96,7)	18 (60,0)	11 (36,7)
Existe un registro de prácticas de higiene y bioseguridad	3 (10,0)	1 (3,3)	2 (6,7)
Antecedentes de salmonelosis	2 (6,7)	0	2 (6,7)
Antecedentes de micotoxicosis	2 (6,7)	1 (3,3)	1 (3,3)
Otra enfermedad	8 (26,7)	5 (16,7)	3 (10,0)

Tabla 5.3. Resultados generales de la encuesta realizada en las 30 granjas muestreadas relativo aspectos del alimento, agua y huevo. Se indican cada una de las preguntas del cuestionario para la totalidad de las granjas, granjas positivas y negativas al aislamiento de *Salmonella* sp.

Aspectos de la encuesta	N° de granjas (%) (N=30)	Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	
		N° de Granjas Positivas (%) (n=18)	N° Granjas negativas (%) (n=12)
Alimento			
Elaboración propia	19 (63,3)	14 (46,7)	5 (16,6)
Compra a terceros	11 (36,7)	4 (13,3)	7 (23,3)
Harina	22 (73,3)	15 (50,0)	7 (23,3)
Pellet	4 (13,3)	1 (3,3)	3 (10,0)
Ambos	4 (13,3)	2 (6,7)	2 (6,7)
Desinfecta el alimento	5 (16,7)	4 (13,3)	1 (3,3)
Utiliza secuestrante de micotoxinas	14 (46,7)	10 (33,3)	4 (13,3)
Utiliza acidificantes	5 (16,7)	3 (10,0)	2 (6,7)
Agua			
Tipo (pozo)	30 (100)	18 (60,0)	12 (40,0)
Desinfección	5 (16,7)	3 (10,0)	2 (6,7)
Análisis de potabilidad de agua	16 (53,3)	9 (30,0)	7 (23,3)
Huevos			
Industrialización	2 (6,7)	1 (3,3)	1 (3,3)
Consumo	5 (16,7)	3 (10,0)	2 (6,7)
Industrialización y consumo	23 (76,7)	14 (46,7)	9 (30,0)
Tipo de maple			
Plástico	2 (6,7)	1 (3,3)	1 (3,3)
Reutiliza	2 (6,7)	1 (3,3)	1 (3,3)
Cartón	8 (26,7)	6 (20,0)	2 (6,7)
Reutiliza	5 (16,6)	4 (13,4)	1 (3,3)
Ambos tipos de envase	20 (66,7)	11 (36,7)	9 (30,0)
Lavado y desinfección del maple	15 (50,0)	10 (33,3)	5 (16,6)
lavado y desinfección del huevo	0	0	0

Tabla 5.4. Resultados del análisis univariado para la identificación de los factores de riesgo para la presencia de *Salmonella* sp. en los 40 galpones de las 30 granjas de gallinas de postura muestreadas.

Variable	n	% de galpones positivos a <i>Salmonella</i>	Valor P
Cantidad de aves			0,009
> 10000	10	80,0	
< 10000	30	30,0	
Edad de las aves			0,458
> 12 meses	23	39,3	
< 12 meses	14	55,6	
Número de aves por jaula			0,053
3 a 4 aves	32	34,4	
más de 5 aves	8	75,5	
Departamento			0,005
Paraná	18	66,7%	
Resto de los departamentos	22	22,7%	
Categoría SENASA			0,229
A	2	100	
B	33	39,4	
C	3	33,3	
Cerco perimetral			1,000
No	3	33	
Si	37	43,2	
Equipo de desinfección			0,680
No	25	40	
Si	15	46	
Otras especies en el predio			0,169
No	14	57,1	
Si	26	34,6	
Control de moscas			1,000
No	7	42,9	
Si	32	43,8	
Control de roedores			1,000
No	1	0	
Si	39	43,6	
Enfermedades previas			0,522
Enfermos	16	37,5	
Sanos	23	47,8	
Origen del alimento			0,046
elaboración propia	25	56	
compra a terceros	15	20	
Cinta para guano			0,067
No	34	35,3	
Si	6	83,3	

Tabla 5.5. Resultado del análisis multivariado para la identificación de los factores de riesgo ($P < 0,05$) para la presencia de *Salmonella* sp. en los galpones de las granjas muestreadas.

Variable	OR*	(95% IC**)	Valor P
Departamento	11,19	1,52-82,33	0,018
Paraná			
Resto (ref.)***			
Cantidad de aves	11,02	0,97-124,07	0,052
>10000			
<10000 (ref)			
Aves por jaula	3,71	0,243-56,66	0,346
> 5 aves			
3-4 aves (ref)			
Cinta para guano	1,96	0,089-43,20	0,670
Si			
No (ref)			
Origen Alimento	2,92	0,45-18,80	0,259
Elaboración propia			
Compra a terceros (ref)			

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

**IC: intervalo de confianza

***Ref: indica la variable de referencia para el cálculo del OR

Por otro lado, debido a que ninguna muestra fue positiva a las aflatoxinas en el contenido del huevo, no se pudo estudiar los factores de riesgo asociados a las mismas.

5.3 Discusión

En el presente estudio, se evaluaron numerosas variables en términos de bioseguridad y características de los galpones con el fin de determinar los posibles factores de riesgo que pudieran haber estado asociados con la presencia de *Salmonella* sp. y/o aflatoxinas en cada uno de los galpones que fueron examinados. Debido a que no se encontró ninguna muestra de huevo positiva a aflatoxinas, no se pudieron analizar los factores de riesgo que pudieran haber estado asociados a su presencia. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la principal vía de intoxicación es a través del alimento. Es evidente que el control, exigencia y rugosidad en la calidad de las materias primas en el momento de la compra y uso de éstas sin contaminación detectable para la elaboración de los piensos, es uno de los primeros pasos a tener en consideración en la eliminación o reducción de las micotoxicosis. Otros factores como son la higiene constante y la

desinfección periódica en el almacenamiento de materias primas y en las plantas de fabricación donde son elaborados los alimentos compuestos, así como el análisis de las materias primas y del producto acabado, deben ser tenidos también en cuenta y puestos en práctica a fin de reducir los riesgos.

La reglamentación N° 614/97 de SENASA (SENASA, 1997) establecía los requisitos para la habilitación de establecimientos avícolas de producción y las normas de higiene para el manejo de residuos. Su aplicación, durante más de diez años permitió identificar la necesidad de actualizar y mejorar las especificaciones técnicas y de aplicación de la norma en granjas avícolas para adoptar medidas de higiene, bioseguridad y protección del ambiente. En el año 2010, debido a la situación internacional sobre enfermedades aviarias, en particular la Influenza Aviar, el SENASA modificó la norma 614/97, surgiendo así la reglamentación 542/2010, en la cual se ampliaron las exigencias y se extremaron las medidas de bioseguridad propuestas para las granjas avícolas. Gran parte de estas exigencias se relevaron en la encuesta realizada en este trabajo de Tesis. Como se determinó en este trabajo de Tesis, en general no existe un conocimiento de la norma vigente, lo que conduce al incumplimiento de la mayoría de los requisitos dispuestos en la misma. Por ejemplo, la mayoría de las granjas ni siquiera cuenta con un equipo para la desinfección de vehículos. Van Hoorebecke *et al.* (2010) identificaron que las medidas de manejo y la bioseguridad como las prácticas de limpieza y desinfección, son factores que protegen y minimizan el riesgo de introducción y persistencia de *Salmonella* dentro de las granjas. Huneau-Salaün *et al.* (2009) demostraron que los transportes que circulaban en cercanías de los galpones aumentaban los riesgos de contaminación con *Salmonella*. Por otro lado, Chemaly *et al.* (2009) evaluaron la presencia de *Salmonella* en cáscaras de huevos provenientes de 28 granjas positivas a esta bacteria, encontrando también que la circulación de los vehículos encargados del traslado de los huevos estaba asociada con la contaminación. Por su parte, Rose *et al.* (1999) llegaron a las mismas conclusiones en granjas de pollos parrilleros. En este sentido, el transporte de insumos e implementos dentro de la granja se transforma en un riesgo sanitario, particularmente si los vehículos que lo realizan no son apropiadamente desinfectados antes de ingresar al predio.

Por otro lado, en este estudio de Tesis se encontró que en la mayoría de los establecimientos se mantenían otras especies animales en estrecho contacto con las aves, ya sea como mascotas o para cumplir otras funciones en las granjas. Cabe señalar que la norma 542/2010 no permite la presencia de otros animales distintos de las aves de producción dentro de la granja. Cabe citar que se ha encontrado la presencia en las granjas examinadas de otras aves, cerdos, bovinos y ovinos u otros como perros y gatos, todos

ellos animales que ponen en riesgo la salud de las aves de la granja. 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). 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. Cabe señalar que la mayoría de las granjas visitadas en este estudio 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. El estudio de los factores de riesgo para *Salmonella* sp. en este trabajo de Tesis no determinó que la presencia de otras especies distintas a las aves de corral en las granjas avícolas fue un factor de riesgo para este patógeno. Esto se pudo deberse, al igual que para otras variables, al número bajo de granjas estudiadas para intentar identificar este factor. De todas maneras, es necesario realizar una concientización en los productores en todo lo referente a estos aspectos, pues de esta manera se podría disminuir la probabilidad de presentación de brotes infecciosos y las consiguientes pérdidas económicas.

Aunque distintas investigaciones descriptivas han identificado fuentes y vectores potenciales de contaminación por *Salmonella* sp., existen pocos estudios epidemiológicos cuantitativos que se hayan realizado en granjas de gallinas de postura (Huneau-Salaün *et al.*, 2009). El procedimiento de análisis de los factores de riesgo asume que la asociación existente entre dicho factor y la enfermedad puede predecir la existencia de la misma. Sin embargo, se debe aclarar que la probabilidad de que un individuo enfrentado a un factor de riesgo esté realmente enfermo puede ser muy baja, es decir, que la mera presencia del factor no tiene valor diagnóstico *per se* sobre la presencia enfermedad individual (Tarabla, 2000). Uno de los factores que puede afectar la prevalencia de *Salmonella* en las instalaciones de una determinada granja es el tamaño del lote. Al respecto Snow *et al.* (2010), en el Reino Unido, informaron que los lotes con más de 30.000 aves exhibieron un significativo aumento de la incidencia de infección por *Salmonella* Enteritidis, en contraste con la menos frecuente infección de los lotes más pequeños (1.000 a 2.999; 3.000 a 9.999 aves). En un estudio realizado en gran escala en los Estados Unidos (USDA, 2000) se demostró que los galpones que tuvieron más de 100.000 gallinas ponedoras fueron 4 veces más propensos a contaminarse con *Salmonella* Enteritidis, que los galpones con menos de

100.000 gallinas. Huneau-Salaün, *et al.* (2009) estudiaron la prevalencia de *Salmonella* en 227 establecimientos, encontrando que aquellos con un número de gallinas ≥ 20.000 tenían 6 veces más probabilidades de contaminación que aquellos con un menor número de aves. En el presente estudio, se demostró que en los galpones con más de 10.000 aves, la probabilidad de presencia de *Salmonella* sp. en el ambiente fue 11 veces mayor que en los galpones que albergan menos de 10.000 aves, dato que podría resultar significativo estadísticamente con un mayor número de galpones analizados. Mollenhorst *et al.* (2005) encontraron resultados similares, señalando como principal factor de riesgo el tamaño del lote. Esto puede deberse a que una mayor densidad de aves restringe su movimiento, aumenta el volumen de heces contaminadas, y dificulta el acceso para la limpieza de las jaulas y accesorios en la instalación (Holt *et al.*, 2011), además de aumentar el número de aves susceptibles que permanecen en riesgo de exposición a los microorganismos (Huneau-Salaün *et al.*, 2009).

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). El presente estudio reveló diferencias significativas en cuanto a la distribución regional de los galpones y los factores de riesgo con respecto a la presencia de *Salmonella* sp. El departamento de Paraná, concentra cerca del 60 % de las granjas de la provincia de Entre Ríos (Shell *et al.*, 2008). Considerando el análisis de los factores de riesgo, los galpones de las granjas de dicho departamento mostraron una alta probabilidad para la presencia de *Salmonella*. La mayor densidad de granjas junto con otras cuestiones de manejo en la zona explicarían esa probabilidad, pero se requieren efectuar más estudios para confirmar la misma.

Muchas de las variables relacionadas con la presencia de *Salmonella* sp. que han sido estudiadas en este trabajo de Tesis no resultaron significativas, como por ejemplo, la edad de las aves, el control de moscas, roedores, y la reutilización de maples. Sin embargo, Humprey *et al.* (1991a) demostraron mediante ensayos experimentales que la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* varía con la edad de las aves. Estos autores infectaron dos grupos de gallinas de 5 y 13 meses de edad con *S. Enteritidis* PT4. El grupo de aves de 5 meses no presentó signos de enfermedad y desarrollaron altos niveles de anticuerpos. En contraste, el grupo de aves de 13 meses de edad tuvo una leve respuesta inmune y

desarrollaron septicemia aguda. Además, el efecto de la edad fue corroborado por Namata *et al.* (2008), quienes realizaron muestreos en 178 granjas de gallinas de postura e identificaron que la mayoría de las aves infectadas tuvieron una edad promedio mayor que aquellas no infectadas. Esto se debe a que el nivel de contaminación ambiental aumenta significativamente durante un ciclo de producción (Van Hoorebeke *et al.*, 2010). Bouzidi *et al.* (2012) estudiaron la prevalencia de *Salmonella* desde el comienzo hasta el final de la postura, tomando muestras en tres oportunidades durante ese periodo. Estos autores encontraron que lotes con aves de 70 a 86 semanas de vida tuvieron una mayor prevalencia de *Salmonella* respecto a la prevalencia que esas mismas aves tuvieron en la etapa inicial de postura.

Tanto los roedores como las moscas también fueron asociados con la presencia de *Salmonella* en diferentes estudios (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 *Salmonella*, ya que estos animales representan una fuente potencial del patógeno. La mayoría de las granjas estudiadas en esta Tesis realizaba controles periódicos de moscas y roedores; lo que pudo haber disminuido la probabilidad de contaminación de los animales con *Salmonella* sp.

Aunque no pudo evaluarse estadísticamente la relación entre la variable “reutilización del maple” y la contaminación por *Salmonella*, el empleo de los maples usados debe ser considerado como una potencial fuente de infección en el caso que la desinfección de los mismos no sea eficiente o directamente no se haya realizado. La reutilización de los maples de cartón que se elaboran para un único uso y su posterior descarte es una inapropiada práctica habitual del sector de gallinas ponedoras, llevada a cabo para reducir costos operativos (Venturino, 2006). Huneau-Salaün *et al.* 2009 demostraron, mediante un análisis univariado, que esta práctica estaba significativamente asociada con la contaminación con *Salmonella* sp. En Argentina, los trabajos de Viora *et al.* (1993) y Soria (2012) demostraron que la contaminación de los maples fue frecuente y ocurrió con diferentes serotipos de *Salmonella*, entre ellos *S. Enteritidis*. Por lo tanto, se debería considerar el descarte, previa esterilización y destrucción obligatoria de los maples usados, para asegurar la higiene alimentaria de los huevos para consumo y para impedir las contaminaciones entre diferentes granjas.

Aunque el origen del alimento no resultó significativo en el análisis de factores de riesgo, existe una tendencia a la elaboración propia del alimento en las granjas positivas al aislamiento de *Salmonella* (14 granjas de un total de 18 positivas). Con los resultados aportados por este estudio no es posible establecer cuáles serían las causas que originan

esta tendencia, pues se necesita investigar cada uno de los procedimientos involucrados en la elaboración, almacenamiento o tratamiento de las raciones que ocurren en cada una de las granjas estudiadas. Maciorowski *et al.* (2006) señalaron que el alimento puede contaminarse con *Salmonella* durante el procesado o el almacenamiento. Esto es válido también para los ingredientes que se combinan con el alimento. Aunque sólo una menor proporción de los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* aislados a partir del alimento causan desórdenes clínicos en los animales, debe considerarse que todas estas salmonelas son potencialmente patógenas para el ser humano. Además, todos estos serotipos colonizan el tracto entérico de las aves, y con su eliminación a través de las excretas producen una permanente contaminación del ambiente de la granja. La importancia de la contaminación con *Salmonella* a través del alimento varía de acuerdo con la región. En aquellos lugares con un nivel bajo de prevalencia, donde las infecciones endémicas están controladas o ausentes, el alimento de los animales es una de las principales vías de entrada del patógeno a la cadena alimenticia. En lugares con prevalencias altas, la contaminación del alimento puede ser menor en comparación con otras fuentes de infección (EFSA, 2008).

5.4. Conclusiones

- ✓ La mayoría de los productores desconocen la existencia de la reglamentación del SENASA actualmente vigente y sus requisitos. Se debe concientizar acerca de la implementación y uso de los equipos de desinfección de vehículos, los beneficios de un registro de prácticas de manejo y otras medidas de bioseguridad.
- ✓ Deben extremarse las medidas de higiene en los galpones, particularmente donde la densidad de las aves en la granja o lote es mayor de 10.000 para disminuir el riesgo de infección con *Salmonella* sp.
- ✓ Existe un mayor porcentaje de granjas positivas a *Salmonella* cuando éstas elaboran su propio alimento. Para intentar mejorar esta situación, se debe implementar un monitoreo y mejor control de salmonelas en los ingredientes que se utilizan para la elaboración de los alimentos balanceados.
- ✓ La mayor prevalencia de salmonelas en el departamento Paraná, supone la existencia de factores de riesgo en esa región que deberán ser objeto de posteriores estudios para lograr su identificación.

Discusión General

En el presente trabajo de Tesis se estudiaron dos aspectos importantes relacionados con la producción de huevos para consumo, tanto desde un punto de vista epidemiológico como económico: la prevalencia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en granjas de gallinas ponedoras y la presencia de salmonelas y aflatoxinas en huevos de la provincia de Entre Ríos. Para ello, previamente se evaluaron diferentes metodologías de detección.

Debido a la importancia de las salmonelas paratíficas como agentes etiológicos de enfermedades zoonóticas y a la erradicación de la tifosis aviar en varios de los países desarrollados, la mayoría de las investigaciones y subsecuentes validaciones que han sido publicadas sobre metodologías de cultivo o técnicas moleculares de PCR han sido exclusivamente enfocadas hacia la recuperación de los serotipos móviles de *Salmonella* (Waldroup *et al.*, 1996; Juven *et al.*, 1984; Löfstrom *et al.*, 2004; Salomonsson *et al.*, 2005; Koyunku y Haggblom, 2009; Koyuncu *et al.*, 2010). Sin embargo, las técnicas de detección de *Salmonella* que han sido empleadas en este trabajo de Tesis evidenciaron deficiencias en cuanto a la capacidad discriminadora de las mismas en lo que respecta a la detección de las biovariedades de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, independientemente de la matriz examinada (alimento, excretas o agua) y de la técnica aplicada. Esto supone que la detección de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en estas muestras ambientales se relaciona con alguna característica inherente a estas biovariedades y con su capacidad de crecimiento. Shoenhard y Stafseth (1953) estudiaron el crecimiento de 5 cultivos puros de *S. Pullorum* en tres medios de cultivo diferentes y demostraron que los tiempos de latencia en cada medio dependieron de las características particulares de cada cepa. Por otro lado, en el capítulo 2 del presente trabajo de Tesis se hace referencia a la posibilidad de que estas biovariedades fueran menos competitivas que las salmonelas móviles en lo que respecta a la flora acompañante. Soria *et al.* (2012) compararon distintas técnicas de cultivo que fueron diseñadas para la detección de *Salmonella* sp. en muestras de contenidos de huevo que habían sido artificialmente contaminadas y no encontraron bacterias totales o enterobacterias que compitiesen con las salmonelas en dichas muestras, logrando recuperar a las biovariedades de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, aun en muy bajas concentraciones iniciales (entre 5 y 10 UFC/ml). Este hecho contrasta con los resultados de esta Tesis, ya que todas las muestras de alimento, agua o excretas presentaron una flora acompañante y, en consecuencia, los límites de detección para las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* fueron altos. Por lo tanto, es posible que la capacidad intrínseca de crecimiento de las biovariedades *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, junto a su interacción con la flora acompañante deban ser consideradas para su detección en las muestras ambientales, las cuales

representan una potencial fuente de transmisión horizontal para las gallinas ponedoras en producción.

Durante el muestreo en las granjas de gallinas ponedoras, realizado en esta Tesis para determinar la prevalencia de *Salmonella*, se incluyeron tanto muestras ambientales como otras tomadas de las aves. Las muestras ambientales son fáciles de recolectar aunque sólo son un reflejo indirecto de la infección (Gast, 2011). En la mayoría de los casos, la infección en las aves adultas es asintomática y la investigación individual de cada ave pierde importancia frente a la necesidad de establecer el nivel de infección poblacional del lote. Carrique-Mas *et al.* (2008) compararon tres metodologías de muestreo ambiental para la detección de *Salmonella* en gallinas ponedoras que se diferenciaban por el número de muestras de excreta y polvo que se recolectaban en las granjas. Estos autores encontraron que la metodología realizada con un mayor número de muestras tuvo mayor sensibilidad que aquellas que fueron efectuadas con un menor número de muestras. En nuestro estudio, la probabilidad de detección fue aumentando a medida que en el análisis se iban incluyendo un mayor número de muestras por granja, sobre todo cuando se incluyeron muestras provenientes de más de un tipo diferente de muestra, encontrando de ese modo un 60% de positividad en las granjas muestreadas. Mahe *et al.* (2008) señalan que la relación entre el número de muestras examinadas y la posibilidad de detección de *Salmonella* en el ambiente es un fiel reflejo de la distribución desuniforme del patógeno en el ambiente. Por otro lado, en este estudio se incluyó la recolección de las aves muertas para cultivar las muestras de órganos. Es importante señalar que las granjas positivas a *S. Gallinarum* fueron detectadas sólo a través del cultivo de órganos. Si no se hubiera tenido en cuenta este tipo de muestra, la presencia de esta biovariedad podría haberse subestimado en lotes con aves portadoras aparentemente sanas. Por otro lado, en estas granjas positivas a *S. Gallinarum* no se aisló ningún otro serotipo. Sin embargo, Terzolo (2011) señala que en la mayoría de los países de Latinoamérica a veces se presentan problemas combinados de tifosis causadas por *S. Gallinarum* y paratifosis causadas por *S. Enteritidis* u otra serovariedad móvil, por lo que la presencia de *S. Gallinarum* no asegura que los establecimientos se encuentren libres de otras salmonelas paratíficas.

Diferentes estudios experimentales señalaron que la producción de huevos contaminados con *S. Enteritidis* suele ser muy baja, aún en aquellas granjas con gallinas infectadas (Humphrey *et al.*, 1991; Gast *et al.*, 2002; Gast y Holt, 2001). En el presente trabajo de Tesis ninguna de las muestras de huevo fue positiva a *Salmonella*. Gast *et al.* (2005) señalan que debido a que la contaminación de los huevos en un lote infectado puede

ocurrir esporádicamente, estas muestras deben recolectarse en diferentes momentos del ciclo de producción del lote para asegurar la detección de cualquier contaminación que pudiera estar ocurriendo. Además, la presencia de *S. Enteritidis* en el ambiente de galpones con gallinas ponedoras ha sido fuertemente correlacionada con la probabilidad de contaminación de los huevos (Henzler *et al.*, 1998). Humprey *et al.* (1989) estudiaron el ciclo de infección de un lote naturalmente contaminado con *S. Enteritidis* y demostraron que existe un patrón temporal de infección, que alterna entre una etapa de mayor frecuencia de producción de huevos contaminados seguida por un periodo de producción esporádica de contaminación. Teniendo en cuenta que en las granjas contaminadas con *S. Enteritidis* que fueron estudiadas en esta Tesis, las salmonelas fueron aisladas tanto a partir de las muestras ambientales como de órganos de aves, es probable que la ausencia de *S. Enteritidis* en los huevos muestreados en esas mismas granjas sea más una consecuencia de la recolección de los mismos en un determinado momento de tiempo (estudio transversal) que un resultado que exprese la real ausencia del patógeno en los huevos. Por otro lado, Gast *et al.* (2003) encontraron que el pasaje de cepas de *S. Enteritidis* entre grupos sucesivos de gallinas ponedoras aumenta la capacidad del patógeno para inducir la producción de huevos contaminados, puesto que esta bacteria se adapta para sobrevivir y colonizar los contenidos del huevo. Schmid *et al.* (2007), luego de identificar una granja de gallinas ponedoras como el posible origen de un brote de salmonelosis, muestrearon los huevos producidos en ese establecimiento y encontraron que todos ellos fueron negativos al aislamiento de salmonelas; con estos resultados no hubo restricción sanitaria para que la granja continúe en producción pero. Sin embargo, un año después esa misma granja fue nuevamente asociada a otro brote de salmonelosis y, luego de un intensivo muestreo ambiental, encontraron que el establecimiento resultó ser positivo a *Salmonella*. Por todo lo anterior, se concluye que la presencia de *Salmonella* Enteritidis en el ambiente de las granjas muestreadas en este trabajo de Tesis representa un serio riesgo para la producción de huevos, aunque no haya sido posible aislar a esta bacteria de los mismos, particularmente debido a la probabilidad de ocurrencia de re-infecciones en los lotes.

Una ventaja del análisis de los factores de riesgo es que los mismos son fáciles de medir y su identificación en una determinada enfermedad específica facilita las medidas de prevención y control (Tarabla, 2000). Desde un punto de vista meramente estadístico, la única variable significativa para considerar como un factor de riesgo, fue la categorización por departamentos, evidenciando que los galpones visitados en las granjas localizadas en Paraná, presentaron un mayor riesgo de exposición a *Salmonella* que aquellos galpones

localizados en otros departamentos de la provincia. Deberá entonces evaluarse en estudios posteriores cuales pudieron haber sido las variables que condicionaron una mayor incidencia de *Salmonella* en esa región. Por otro lado, aunque la variable “cantidad de aves” en rigor no fue estadísticamente significativa ($P=0,052$), su proximidad al límite de significancia nos indica una tendencia de su relación con el aislamiento de *Salmonella*. El número de aves por galpón como factor de riesgo fue exhaustivamente demostrado por distintos autores (USDA, 2000; Mollenhorst *et al.*, 2005; Snow *et al.*, 2010; Huneau-Salaün *et al.*, 2009). En el estudio de esta Tesis, es importante considerar que de los 10 galpones agrupados en la categorización “>10.000 aves”, el 80% fue positivo a *Salmonella*. Dejando de lado el análisis de los factores de riesgo y considerando los resultados de las encuestas que fueron realizadas se detectaron prácticas que evidentemente van en detrimento de la higiene de la granja, tal como por ejemplo la ausencia de desinfección de los vehículos que ingresan al predio y la reutilización de maples que deberían haber sido descartados. Por lo tanto es fundamental reforzar los aspectos de bioseguridad en este tipo de establecimientos de crianza intensiva de aves a fin de asegurar la inocuidad de la producción de huevos y, de este modo, proteger a la población frente a infecciones alimentarias transmitidas por huevos para consumo.

En cuanto a la presencia de aflatoxinas en las claras o yemas de los huevos de las granjas que fueron muestreadas en esta Tesis, no se encontró ninguna contaminación que pudiera haber sido detectada dentro de los niveles alcanzados por la técnica que fue empleada. En este punto se debe considerar que, de acuerdo a los distintos trabajos publicados en los que se hace referencia a tasas de pasaje de aflatoxinas desde el alimento a los huevos, las mismas son muy variables y dependen de los niveles de contaminación que han sido utilizados en los ensayos, informándose un rango desde 2000:1 a 40.000:1 (Jacobson y Wiseman, 1974; Trucksess *et al.*, 1983; Micco *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2000; Bintvihok *et al.*, 2002; Zaghini *et al.*, 2005; Salwa y Anwer, 2009). De acuerdo con algunos reportes de contaminación natural de maíz y alimentos balanceados para aves de corral, se registran concentraciones desde 1 hasta 1.620 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 en esas matrices, siendo los niveles promedios menores a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Varsavsky *et al.*, 1979; Dalcero *et al.*, 1997; Mallman *et al.*, 2007; Pereyra *et al.*, 2011). Por otro lado, Mallman *et al.* (2007) recomendaron distintos límites de seguridad de aflatoxinas totales para aves de producción, sugiriendo que niveles mayores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ son peligrosos para ponedoras comerciales. En base a los trabajos de tasa pasaje de AFB_1 desde el alimento al huevo publicados en gallinas de postura, la técnica de detección de esta toxina utilizada en este trabajo de Tesis

permitiría detectar AFB₁ en huevo a partir de niveles de contaminación en alimentos de estas aves de 260 µg/kg, lo que no es muy común en contaminaciones naturales. De todas maneras, los límites aceptables para AFB₁ y aflatoxinas totales en alimentos para humanos son 5 y 10 µg/kg, respectivamente, en más de 75 países del mundo y 2 y 4 µg/kg en la Unión Europea (Herzallah, 2009). Dado que el huevo, aun cuando no tiene una regulación como tal, es considerado un alimento, que además es altamente consumido por el hombre, la técnica empleada en este trabajo de Tesis detectó niveles más bajos que los límites sugeridos para un alimento y, de esta manera, puede dar garantía de la inocuidad del huevo para consumo humano.

Conclusiones Finales

- ✓ La dificultad para detectar las biovariedades *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* con las técnicas de cultivo representa un problema a la hora de definir una muestra de alimento, agua o excreta como negativa para estas biovariedades.
- ✓ Aunque se considera al MSRVR como un medio de cultivo sólo diseñado para el aislamiento de serotipos móviles, este estudio demuestra que este medio también puede ser utilizado para la detección de *S. Gallinarum* en muestras de excreta cuando se toma del medio en los casos que no hay halo de crecimiento. Las metodologías puestas a punto en esta Tesis para muestras de agua representan una alternativa ante la falta de protocolos estandarizados para el aislamiento de *Salmonella* en este tipo de matriz.
- ✓ De acuerdo a los resultados de las muestras que fueron analizadas en 30 establecimientos de crianza intensiva, se estima que la prevalencia de *Salmonella* en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Entre Ríos oscilaría alrededor de un 60%.
- ✓ Los huevos producidos en las granjas muestreadas aparentemente no representarían un riesgo para el consumo humano, ya que las muestras de cáscaras y contenidos fueron todas negativas a *Salmonella*. Sin embargo, debe considerarse que, de acuerdo con la experiencia reportada en la literatura, la presencia de *S. Enteritidis* en cuatro de las granjas examinadas siempre representa un riesgo de pasaje de este patógeno a los huevos en un determinado momento de la crianza de las aves.
- ✓ Los galpones de las granjas ubicadas en el departamento Paraná están más expuestos a la contaminación por *Salmonella* sp., aunque se requieren más estudios en esas granjas para determinar las causas de la mayor incidencia.
- ✓ No se encontraron niveles detectables de aflatoxinas en los huevos de las granjas muestreadas. Los huevos examinados serían totalmente negativos o tendrían niveles de aflatoxinas que estarían muy por debajo de los rangos permitidos y son, por lo tanto, apropiados para el consumo humano.

Proyecciones

- ✓ Mejorar las técnicas de cultivo para el aislamiento de los biovares *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* a partir de muestras ambientales como alimento, excretas y agua de aves de corral.
- ✓ Realizar muestreos sucesivos de las granjas que resultaron positivas a *Salmonella* para determinar si existe contaminación de los huevos producidos.
- ✓ Realizar cuestionarios que generen información acerca de las prácticas de manejo del alimento utilizado en las granjas.
- ✓ Realizar cuestionarios más profundos sobre las medidas de bioseguridad en el departamento Paraná.
- ✓ Mejorar los límites de detección de la técnica para la detección de aflatoxinas en huevo y determinar si existe contaminación por estas toxinas en los alimentos que consumen las aves.
- ✓ Informar y concientizar a los productores acerca de los beneficios de la aplicación de medidas de bioseguridad en sus sistemas de producción.

Referencias Bibliográficas

- Abriata, G., E. Poyard, L. Roques, G. Hamse y M. O. Codebó. 2006. Boletín Epidemiológico Periódico. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Buenos Aires, Argentina.
- AGC, Agencia Gubernamental de Control. 2011. Enfermedades transmitidas por alimentos. <http://www.agcontrol.gob.ar/pdf/Que-son-las-ETA.pdf>. Acceso Febrero 2013.
- Agron, P. G., R. L. Walker, H. Kinde, S. J. Sawyer, D. C. Hayes, J. Wollard y G. L. Andersen. 2001. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella* enterica serovar enteritidis. Applied and Environmental Microbiology 67:4984-4991.
- Aho, P. y C. Wright. 2010. La sustentabilidad y la industria avícola. Industria Avícola. 57: 12-38.
- Akande, K. E., M. M. Abubakar, T. A. Adegbola y S. E. Bogoro. 2006. Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. Pakistan Journal of Nutrition 5:398-403.
- Alvarez, J., M. Sota, A. B. Vivanco, I. Perales, R. Cisterna, A. Rementeria y J. Garaizar. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 42:1734-1738.
- Albarrán, P., M. Cruz-Coke y M. Gandarillas. 2011. La nueva forma de producir huevos. Revista Agronomía y Forestal 41:30-35.
- Allen, N. K., C. J. Mirocha, G. Weaver, S. Aakhus-Allen y F. Bates. 1981. Effects of dietary zearalenone on finishing broiler chickens and young turkey poults. Poultry Science 60:124-131.
- Alvarado, I. R. 2009. Control de *Salmonella* Enteritidis en ponedoras comerciales. Industria Avícola 56:18-21
- Amini, K., T. Z. Salehi, G. Nikbakht, R. Ranjbar, J. Amini y S. B. Ashrafganjooei. 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* enteritidis isolated from human and animals in Iran. African Journal of Microbiology Research 4:2202-2210.
- Andretta, I., M. Kipper, C. R. Lehnen, L. Hauschild, M. M. Vale y P. A. Lovatto. 2011. Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in broilers. Poultry Science 90:1934-1940.
- Andrews, W.H. 1986. Resuscitation of injured *Salmonella* spp. and coliforms from foods. Journal of Food Protection 49: 62-75.
- Anastassiades, M., S. J. Lehotay, D. Stajnbaher y F. J. Schenck. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86:412-431.

- Anónimo, 2012. Tendencias Avícolas Mundiales 2011. América produce 20 por ciento del huevo del mundo. <http://www.elsitioavicola.com/articles/2144/tendencias-avacolas-mundiales-2011-america-produce-20-por-ciento-del-huevo-del-mundo>. Acceso Diciembre 2012
- Asencio, E. A. 2009. Fisiología Aviar. Páginas 21-22. Universitat de Lleida. Lleida, España.
- Bailey, J. S. 1988. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. *Poultry Science* 67:928-932.
- Bansal, N. S., V. Gray y F. McDonell. 2006. Validated PCR assay for the routine detection of *Salmonella* in food. *Journal of Food Protection* 69:282-287.
- Barrow, P. A., M. A. Lovell y A. Berchieri. 1991. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella* enteritidis phage type 4. *Avian Pathology* 20:681-692.
- Barrow, P. A. y O. C. Freitas Neto. 2011. Pullorum disease and fowl typhoid: new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology* 40:1-13.
- Baylis, C. L., S. MacPhee y R. P. Betts. 2000. Comparison of two commercial preparations of buffered peptone water for the recovery and growth of *Salmonella* bacteria from foods. *Journal of Applied Microbiology* 89:501-510.
- Bell, C. y A. Kyriakides. 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.
- Bennett, J. W. y M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497-516.
- Berchieri, A., Jr., A. M. Iba, and P. A. Barrow. 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.
- Berchieri Júnior, A., G. H. de Oliveira, L. A. Soeiro Pinheiro y P. A. Barrow. 2000. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:50-52.
- Betancor, L., M. Pereira, A. Martinez, G. Gioiosa, M. Fookes, K. Flores, P. Barrios, V. Repiso, R. Vignoli, N. Cordeiro, G. Algorta, N. Thomson, D. Maskell, F. Schelotto y J. A. Chabalgoity. 2010. Prevalence of *Salmonella* enterica in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology* 48:2413-2423.
- Beutlich, J., S. Jahn, B. Malorny, E. Hauser, S. Huhn, A. Schroeter, M. R. Rodicio, B. Appel, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth y B. Guerra. 2011. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella* enterica isolates from different origins. *Applied and Environmental Microbiology* 77:5655-5664.

- Bintvihok, A., S. Thiengnin, K. Doi y S. Kumagai. 2002. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *Journal of Veterinary Medical Science* 64:1037-1039.
- Bohn, L., A. S. Meyer y S. K. Rasmussen. 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B* 9:165-191
- Bouzidi, N., L. Aoun, M. Zeghdoudi, M. Bensouilah, R. Elgroud, I. Oucief, S. A. Granier, A. Brisabois, L. Desquilbet y Y. Millemann. 2012. *Salmonella* contamination of laying-hen flocks in two regions of Algeria. *Food Research International* 45:897-904
- Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe y B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2465-2467.
- Brooks, B. W., C. L. Lutze-Wallace, J. Devenish, M. Elmufti y T. Burke. 2012. Development of an antigen-capture monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with culture for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in poultry hatchery environmental samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24:509-515. .
- Bueno, D. J., M. Salvano, J. O. Silva, S. N. González y G. Oliver. 2001. Micotoxinas: diagnóstico y prevención en aves de corral. *Boletín Micológico* 16:23-36.
- Busani, L., A. Cigliano, E. Taioli, V. Caligiuri, L. Chiavacci, C. Di Bella, A. Battisti, A. Duranti, M. Gianfranceschi, M. C. Nardella, A. Ricci, S. Rolesu, M. Tamba, R. Marabelli y A. Caprioli. 2005. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in foods of animal origin in Italy. *Journal of Food Protection* 68:1729-1733.
- Busse, M. 1995. Media for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 26:117-131.
- Caffer, M.I. y R. Terragno. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud Subsecretaría de Investigación y Tecnología. Buenos Aires, Argentina
- Caffer, M. I. y M. Pichel. 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. Asociación Argentina de zoonosis, Buenos Aires, Argentina.
- Caffer, M.I. y R. Terragno. 2008. Familia *Enterobacteriaceae*. Páginas 1-5 en: Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina.
- Caffer, M. I., A. Alcain, M. Panagopulo, M. Moroni, S. Brengi y R. Terragno. 2010. Serovariedades de *Salmonella* spp. en Argentina, 2007-2009. *Revista Argentina de Microbiología* 42:80.

- Capita, R., M. Alvarez-Astorga, C. Alonso-Calleja, B. Moreno y M. del Camino Garcia-Fernandez. 2003. Occurrence of *salmonellae* in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 81:169-173.
- Capriotti, A. L., C. Cavaliere, S. Piovesana, R. Samperi y A. Lagana. 2012. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. *Journal of Chromatography A* 1268:84-90.
- Carli, K. T., C. B. Unal, V. Caner, and A. Eyigor. 2001. Detection of salmonellae in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1871-1876.
- Carrique-Mas, J. J. y R. H. Davies. 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., S. Barnes, I. McLaren y R. Davies. 2009. Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D). *Journal of applied microbiology* 107:1976-1983.
- CAST. 2003. Mycotoxins: risk in plant, animal and human Systems. Council for Agricultural Science and Technology, Ames.
- Castellan, D. M., H. Kinde, P. H. Kass, G. Cutler, R. E. Breitmeyer, D. D. Bell, R. A. Ernst, D. C. Kerr, H. E. Little, D. Willoughby, H. P. Riemann, A. Ardans, J. A. Snowdon y D. R. Kuney. 2004. Descriptive study of California egg layer premises and analysis of risk factors for *Salmonella enterica* serotype enteritidis as characterized by manure drag swabs. *Avian Diseases* 48:550-561
- C.E. 2006. Reglamento UE N°165/2010
- C.E. 2006. Reglamento UE N°401/2006
- CDC. 2011. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2009 (Final Report). Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention.
- Chacana, P. y H. Terzolo. 2003. Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. *Revista de Medicina Veterinaria* 84:14-20.
- Chappell, L., P. Kaiser, P. Barrow, M. A. Jones, C. Johnston y P. Wigley. 2009. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128:53-59.

- Chemaly, M., A. Huneau-Salaun, A. Labbe, C. Houdayer, I. Petetin y P. Fravallo. 2009. Isolation of *Salmonella enterica* in laying-hen flocks and assessment of eggshell contamination in France. *Journal of Food Protection* 72:2071-2077.
- Chen, D., X. Cao, Y. Tao, Q. Wu, Y. Pan, L. Huang, X. Wang, Y. Wang, D. Peng, Z. Liu y Z. Yuan. 2012. Development of a sensitive and robust liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and a pressurized liquid extraction for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal derived foods. *Journal of Chromatography A* 1253:110-119.
- Chi, M., S. C. J. Mirocha, H. J. Kurtz, G. A. Weaver, F. Bates, T. Robison y W. Shimoda. 1980. Effect of dietary zearalenone on growing broiler chicks. *Poultry Science* 59:531-536.
- Chu, F.S. 2006. Mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. Páginas 583-629 en *Foodborne Infectious and Intoxications*. H.P. Rieman y D.O.Oliver (Eds.) Academic Press, Amsterdam.
- Chung, Y. H., S. Y. Kim y Y. H. Chang. 2003. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from foods in Korea from 1993 to 2001. *Journal of Food Protection* 66:1154-1157.
- COFECYT. 2008. Debilidades y Desafíos Tecnológicos del Sector Productivo. http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pdf/productos_alimenticios/Lacteos_y_Carnes/Carne_Avicola_y_ovoproductos.pdf. Acceso Diciembre de 2012
- Cogan, T. A., G. Domingue, H. M. Lappin-Scott, C. E. Benson, M. J. Woodward y T. J. Humphrey. 2001. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *International Journal of Food Microbiology* 70:131-141.
- Cogan, T. A., F. Jorgensen, H. M. Lappin-Scott, C. E. Benson, M. J. Woodward y T. J. Humphrey. 2004. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiology* 150:1063-1071.
- Cox, N. A., B. H. Davies, J. H. Kendall, A. B. Watts y A. R. Colmer. 1972. A comparison of various enrichment broths and plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry feces and poultry foods products. *Poultry Science* 51:1312-1316.
- Cox, N. A., J. S. Bailey, J. E. Thomson y B. J. Juven. 1983. *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae* found in commercial poultry feed. *Poultry Science* 62:2169-2175
- Dalcerro, A., C. Magnoli, M. Luna, G. Ancasi, M. M. Reynoso, S. Chiacchiera, R. Miazzo y G. Palacio. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 141:37-43.

- Dalcerro, A., C. Magnoli, M. Luna, G. Ancasi, M. M. Reynoso, S. Chiacchiera, R. Miazzi y G. Palacio. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 141:37-43.
- Dawson, B y R. G. Trapp. 2005. Bioestadística médica. Manual Moderno. México
- de Almeida Filho, N., L. D. Castiel y J. R. Ayres. 2009. Riesgo: concepto básico de la epidemiología. *Salud Colectiva* 5:323-344.
- De Buck, J., F. Van Immerseel, F. Haesebrouck y R. Ducatelle. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology* 97:233-245.
- De Franceschi, M., R. J. Anselmo, H. Barrios, S. Viora, S. Rondelli y E. Fliess. 1988. Detección de *Salmonella* a partir de muestras de materias primas de origen animal para alimentos balanceados. *Therios* 12:240-248
- De Franceschi, M., S. Viora, R. Anselmo, H. Barrios, B. Llorente, T. Eigure, M. I. Caffer, B. Fronckowsky y E. Flies. 1989. Investigación de *Salmonella* en alimentos balanceados para aves. *Therios* 14:146-151
- De Reu, K., K. Grijspeerdt, M. Heyndrickx, J. Zoons, K. De Baere, M. Uyttendaele, J. Debevere y L. Herman. 2005. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *British Poultry Science* 46:149-155.
- De Reu, K., K. Grijspeerdt, M. Heyndrickx, M. Uyttendaele, J. Debevere y L. Herman. 2006. Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. *British Poultry Science* 47:163-172.
- Deng, S. X., A. C. Cheng, M. S. Wang y P. Cao. 2007. Gastrointestinal tract distribution of *Salmonella* enteritidis in orally infected mice with a species-specific fluorescent quantitative polymerase chain reaction. *World Journal of Gastroenterology* 13:6568-6574
- Deng, S. X., A. C. Cheng, M. S. Wang, P. Cao, B. Yan, N. C. Yin, S. Y. Cao y Z. H. Zhang. 2008. Quantitative studies of the regular distribution pattern for *Salmonella* enteritidis in the internal organs of mice after oral challenge by a specific real-time polymerase chain reaction. *World Journal of Gastroenterology* 14:782-789
- del Pozo Saenz, E., V. Leyva Castillo, O. Pérez Rodríguez, M. de los Reyes Torres y Y. Ferrer Marquez. 2001. Serotipos de *Salmonella* aisladas de pienso de gallinas ponedoras. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 15:26-30
- DGPA. 2007. Información de la Actividad avícola en Entre Ríos, septiembre 2007. Secretaría de la Producción, Área avícola y Porcina

- Desmarchelier, A., J. M. Oberson, P. Tella, E. Gremaud, W. Seefelder y P. Mottier. 2010. Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:7510-7519.
- Dias de Oliveira, S., C. R. Rodenbusch, G. B. Michael, M. I. R. Cardoso, C. W. Canal y A. Brandelli. 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:123-124.
- Dohlman, E. 2004. Mycotoxin Regulations Implications for International Agricultural Trade. http://www.ers.usda.gov/media/561524/aib789-6_1_.pdf.
- Douglas, A., R. C. Stanley y F. J. Holler. 2008. Principios de Análisis Instrumental. Páginas 826-827. S. C. Gonzáles ed. Cengage Learning Editores, Mexico DF.
- Dunkley, K. D., T. R. Callaway, V. I. Chalova, J. L. McReynolds, M. E. Hume, C. S. Dunkley, L. F. Kubena, D. J. Nisbet y S. C. Ricke. 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe* 15:26-35.
- Edel, W. y E. H. Kampelmacher. 1974. Comparative studies on *Salmonella* isolations from feeds in ten laboratories. *Bull World Health Organ* 50:421-426
- Edwards, P. R. y W. H. Ewing. 1986. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reaction. Páginas 47-72 en *Identification of the Enterobacteriaceae*. Elsevier Science Publishing Co., Inc, New York, N.Y.
- EFSA. 2006. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal* 97:1-84.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008a. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. *EFSA Journal* 720: 1-84.
- EFSA. 2008b. A quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat. Source attribution for human salmonellosis from meat. *EFSA Journal* 625:1-32.
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on Hatchery Waste as animal by-products. *EFSA Journal* 9:23-21
- El-Tras, W. F., A. A. Tayel y A. Samir. 2010. Potential zoonotic pathways of *Salmonella* Enteritidis in laying farms. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 10:739-742.
- Entis, P. 2002. Food Microbiology. The Laboratory. Páginas 25-48. Foods Processors Institute ed., Washington DC, U.S.A.
- Espinosa, C. 2007. Relevamiento y Calificación de Granjas por el SENASA. Primera Jornada de actualización Avícola del Grupo de Trabajo Avícola. Parada Robles, Buenos Aires, 27 de Abril.

- Eriksson, E. y A. Aspan. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Veterinary Research 3:21
- Executive Guide. 2012. Global poultry and egg market projections. Executive Guide: 12-16.
- FDA 2008. Environmental Sampling and Detection of *Salmonella* in Poultry Houses. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114716.htm>. Acceso Diciembre 2012.
- Feberwee, A., T. S. de Vries, E. G. Hartman, J. J. de Wit, A. R. Elbers y W. A. de Jong. 2001. Vaccination against *Salmonella* enteritidis in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella* gallinarum 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic *Salmonella* tests. Avian Diseases 45:83-91.
- Foley, S. L., A. M. Lynne y R. Nayak. 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. Journal of Animal Science 86:149-162
- Fredricks, D. N. y D. A. Relman. 1999. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. Clinical Infectious Diseases 29:475-486.
- Galan, J. E., C. Ginocchio y P. Costeas. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. Journal of Bacteriology 174:4338-4349.
- Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck y F. Van Immerseel. 2008. *Salmonella* enterica serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. Applied and Environmental Microbiology 74:6616-6622.
- Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey y F. Van Immerseel. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiology Reviews 33:718-738.
- Garcia, K. O., A. M. Santana, O. C. F. Neto, K. M. M. G. Simplício, A. C. Alessi, Â. Berchieri Júnior y J. J. Fagliari. 2010. Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar Gallinarum strain: blood serum components and histopathological changes Brazilian Journal of Veterinary Pathology 3:111-117.
- Garcia, C., J. M. Soriano, V. Benitez y P. Catala-Gregori. 2011. Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. Poultry Science 90:1581-1585.
- Garrido Frenich, A., R. Romero-Gonzalez, M. L. Gomez-Perez y J. L. Vidal. 2011. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1218:4349-4356

- Garzón, J. M., A. Izaguirre y N. Zurita 2010. Aspectos productivos, comerciales y económicos de la Cadena Aviar en Argentina. http://www.acipan.org.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=137&Itemid=49. Acceso Febrero 2013
- Gast, R. K. y C. W. Beard. 1993. Research to understand and control *Salmonella* enteritidis in chickens and eggs. *Poultry Science* 72:1157-1163.
- Gast, R. K. y P. S. Holt. 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poultry Science* 80:997-1002.
- Gast, R. K., M. S. Nasir, M. E. Jolley, P. S. Holt y H. D. Stone. 2002. Detection of experimental *Salmonella* enteritidis and *S. typhimurium* infections in laying hens by fluorescence polarization assay for egg yolk antibodies. *Poultry Science* 81:1128-1131
- Gast, R.K. 2003. Páginas 583-599. Paratyphoid infections. In *Diseases of Poultry*. Y.M. Saif, H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, D. E. Swayne (eds.). Iowa State Press. USA.
- Gast, R. K., M. S. Nasir, M. E. Jolley, P. S. Holt y H. D. Stone. 2002. Detection of experimental *Salmonella* enteritidis and *S. typhimurium* infections in laying hens by fluorescence polarization assay for egg yolk antibodies. *Poultry Science* 81:1128-1131
- Gast, R. K., J. Guard-Bouldin y P. S. Holt. 2005. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases* 49:382-386
- Gast, R. K. 2007a. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Diseases* 51:817-828. Gast, R. K., Guraya, R.; Guard-Bouldin, J.; Holt, P. S. y Moore, R. W. 2007b. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases*. 51:40-44
- Gast, R. K. 2008. Paratyphoid infections. Páginas 636-655. En *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan y D. E. Swayne eds. Blackwell Ames IA.
- Gast, R.K. 2011. Controlling egg contamination with *Salmonella* Enteritidis by understanding its pathobiology. XXII Latin American Poultry Congress.
- Gast, R. K., R. Guraya, J. Guard y P. S. Holt. 2011a. The relationship between the numbers of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, or *Salmonella* Hadar colonizing reproductive tissues of experimentally infected laying hens and deposition inside eggs. *Avian Diseases* 55:243-247.

- Gast, R. K., R. Guraya, J. Guard y P. S. Holt. 2011b. Frequency and Magnitude of Internal Organ Colonization Following Exposure of Laying Hens to Different Oral Doses of *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Poultry Science* 10:325-331.
- Gast, R. K.; Guraya, R.; Guard J. y Holt, P.S. 2011c. Frequency and persistence of fecal shedding following exposure of laying hens to different oral doses of *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Poultry Science* 10: 325-331.
- Gast, R. K., R. Guraya y J. Guard. 2013. *Salmonella enteritidis* deposition in eggs after experimental infection of laying hens with different oral doses. *Journal of Food Protection* 76:108-113.
- Geeraerd, A. H., V. P. Valdramidis y J. F. Van Impe. 2005. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102:95-105.
- Gernat, A. 2004. Poultry farm biosecurity. North Carolina State University Dept. of Poultry Science, North Carolina Cooperative Extension Service.
- Gimeno, A. 2009. Revisión de las concentraciones máximas tolerables para ciertas micotoxinas. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/5663/ARTICULOS-NUTRICION-ARCHIVO/Revision-de-las-concentraciones-maximas-tolerables-para-ciertas-micotoxinas.html>. Acceso Enero 2013.
- Gimeno, A. y M.L. Martins. 2011. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Special Nutrients, Inc. Miami.
- Glahn, R. P. y R. F. Wideman, Jr. 1987. Avian diuretic response to renal portal infusions of the mycotoxin citrinin. *Poultry Science* 66:1316-1325.
- Gonzalez, A. B. 1966. Lactose-fermenting *Salmonella*. *Journal of Bacteriology* 91:1661-1662.
- Goossens, H., G. Wauters, M. de Boeck, M. Janssens y J. P. Butzler. 1984. Semisolid selective-motility enrichment medium for isolation of salmonellae from fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 19:940-941.
- Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology* 3:421-430.
- Guerin, M. T., S. W. Martin, G. A. Darlington y A. Rajic. 2005. A temporal study of *Salmonella* serovars in animals in Alberta between 1990 and 2001. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69:88-99.
- Hamilton, P. B., W. E. Huff, J. R. Harris y R. D. Wyatt. 1982. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Science* 61:1832-1841.
- Hammack, T. S., R. M. Amaguana, G. A. June, P. S. Sherrod y W. H. Andrews. 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 load. *Journal of Food Protection* 62:16-21.
- Henry, M. H., R. D. Wyatt y O. J. Fletchert. 2000. The toxicity of purified fumonisin B₁ in broiler chicks. *Poultry Science* 79:1378-1384.
- Henzler, D. J., D. C. Kradel y W. M. Sicho. 1998. Management and environmental risk factors for *Salmonella* enteritidis contamination of eggs. *American Journal of Veterinary Research* 59:824-829
- Herzallah, S. M. 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry* 114:1141-1146
- Hoerr, F. J. 2003. Mycotoxicoses. Páginas 1103-1132 en *Diseases of Poultry*. Y. M. saif ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Holt, P. S., R. H. Davies, J. Dewulf, R. K. Gast, J. K. Huwe, D. R. Jones, D. Waltman y K. R. Willian. 2011. The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poultry Science* 90:251-262.
- Hong, Y., T. Liu, M. D. Lee, C. L. Hofacre, M. Maier, D. G. White, S. Ayers, L. Wang, R. Berghaus y J. J. Maurer. 2008. Rapid screening of *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BioMedCentral Microbiology* 8:178.
- Hosmer, D. W. y S. Lemeshow. 2004. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons eds New Jersey, USA.
- Howard, Z. R., A. C. O'Bryanb, P. G. Crandallb y S. C. Rickeb. 2012. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Research International* 45:755-764.
- Hsu, B. M., K. H. Huang, S. W. Huang, K. C. Tseng, M. J. Su, W. C. Lin, D. D. Ji, F. C. Shih, J. L. Chen y P. M. Kao. 2011. Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. *The Science of the Total Environment* 409:4435-4441
- Huberman, Y. D. 2010. Tifosis Aviar. http://wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/tifosis_aviar_-_yosef_huberman.pdf. Acceso Diciembre 2012.
- Humphrey, T. J., A. Baskerville, S. Mawer, B. Rowe y S. Hopper. 1989. *Salmonella* enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiology and Infection* 103:415-423.
- Humphrey, T. J. 1990. Heat resistance in *Salmonella* enteritidis phage type 4: the influence of storage temperatures before heating. *The Journal of applied bacteriology* 69:493-497.

- Humphrey, T. J., H. Chart, A. Baskerville y B. Rowe. 1991a. The influence of age on the response of SPF hens to infection with *Salmonella* Enteritidis PT4. *Epidemiology and Infection* 106:33-43
- Humphrey, T. J., A. Whitehead, A. H. Gawler, A. Henley y B. Rowe. 1991b. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection* 106:489-496.
- Huneau-Salaün, A., C. Marianne, B. Sophie le, L. Francoise, P. Isabelle, R. Sandra, M. Virginie, F. Philippe y R. Nicolas. 2009. Risk factors for *Salmonella* enterica subsp. enterica contamination in 519 French laying hen flocks at the end of the laying period. *Preventive Veterinary Medicine* 89:51-58.
- ISO (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. http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?icsnumber=42109&ics1=07&ics2=100&ics3=30.
- Jacobson, W. C. y H. G. Wiseman. 1974. The transmission of aflatoxin B₁ into eggs. *Poultry Science* 53:1743-1745.
- Jakić-Dimić, D., K. Nešić y M. Petrović. 2009. Mycotoxins in feed for pigs and poultry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25:1149-1154.
- Jasson, V., L. Jacxsens, P. Luning, A. Rajkovic y M. Uyttendaele. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27:710-730.
- Jeffries, L. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of Salmonellae from faeces. *Journal of Clinical Pathology* 12:568-571.
- Jeníková, G., J. Pazlarová y K. Demnerová. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int Microbiol* 3:225-229.
- Jonchère, V., S. Rehaut-Godbert, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, V. Sibut, L. A. Cogburn, Y. Nys y J. Gautron. 2010. Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. *Bio-Med-Central Genomics* 11:57.
- Jones, F. T. y K. E. Richardson. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poultry Science* 83:384-391.
- Juven, B. J., N. A. Cox, J. S. Bailey, J. E. Thomson, O. W. Charles y J. V. Shutze. 1984. Recovery of *Salmonella* from artificially contaminated poultry feed in non-selective and selective broth media. *Journal of Food Protection* 47:299-302.

- Kang, H., C. Loui, R. I. Clavijo, L. W. Riley y S. Lu. 2006. Survival characteristics of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Epidemiology and Infection* 134:967-976.
- Kang, M. S., Y. K. Kwon, B. Y. Jung, A. Kim, K. M. Lee, B. K. An, E. A. Song, J. H. Kwon y G. S. Chung. 2011. Differential identification of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes. *Veterinary Microbiology* 147:181-185.
- Kang, M. S., Y. K. Kwon, H. R. Kim, J. Y. Oh, M. J. Kim, B. K. An, E. G. Shin, J. H. Kwon y C. K. Park. 2012. Differential identification of *Salmonella* enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Veterinary Microbiology* 160:491-495.
- Kaspers, B., H. Bondl y T. W. Gobel. 1996. Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 43:225-231.
- Kendra, D. F. y R. B. Dyer. 2007. Opportunities for biotechnology and policy regarding mycotoxin issues in international trade. *International Journal of Food Microbiology* 119:147-151.
- Kinde, H., D. M. Castellan, D. Kerr, J. Campbell, R. Breitmeyer y A. Ardans. 2005. Longitudinal monitoring of two commercial layer flocks and their environments for *Salmonella* enterica serovar enteritidis and other Salmonellae. *Avian Diseases* 49:189-194.
- King, S. y W. I. Metzger. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. hektoen enteric agar. *Applied Microbiology* 16:577-578.
- Küilholma, J. 2007. Food-safety concerns in the poultry sector of developing countries. http://www.fao.org/AG/againfo/home/events/bangkok2007/docs/part2/2_8.pdf. Accessed Enero 2013.
- Koesukwiwat, U., S. J. Lehotay, S. Miao y N. Leepipatpiboon. 2010. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217:6692-6703
- Kovacs-Nolan, J., M. Phillips y Y. Mine. 2005. Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:8421-8431
- Koyuncu, S. y P. Haggblom. 2009. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. *BioMedCentral Veterinary Research* 5:6.
- Koyuncu, S., M. G. Andersson y P. Haggblom. 2010. Accuracy and sensitivity of commercial PCR-based methods for detection of *Salmonella* enterica in feed. *Applied of Environmental Microbiology* 76:2815-2822.

- Krska, R., P. Schubert-Ullrich, A. Molinelli, M. Sulyok, S. MacDonald y C. Crews. 2008. Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives & Contaminants* 25:152-163.
- Kuijpers, A. F. A., C. Veenman, J. van de Kasstele, and K. A. Mooijman. 2008. EU Interlaboratory comparison study food II (2007). Bacteriological detection of *Salmonella* in minced chicken meat. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu) Report 330604010/2008. RIVM, Bilthoven, the Netherlands.
- Kuijpers, A. F. A., C. Veenman, J. van de Kasstele, and K. A. Mooijman. 2010. EU Interlaboratory comparison study food III (2009). Bacteriological detection of *Salmonella* in minced chicken meat. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu) Report 330604017/2010. RIVM, Bilthoven, the Netherlands
- Kurkjian, K. M., S. E. Little, S. D. Nath y C. Brown. 2010. Introducción y vías de transmisión de las enfermedades animales exóticas. Páginas 18-28 en *Enfermedades emergentes y exóticas de los animales*. A. R. Spickler, J. A. Roth, J. Galyon, J. Lofstedt y M. V. Lenardón eds. Center for Food Security and Public Health and the Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Ames, Iowa, USA.
- Kwon, Y. K., A. Kim, M. S. Kang, M. Her, B. Y. Jung, K. M. Lee, W. Jeong, B. K. An y J. H. Kwon. Prevalence and characterization of *Salmonella* Gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. *Poultry science* 89:236-242.
- Lamelas, k., G. Mair y G. Beczkowski. 2011. Boletín avícola: anuario 2010. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 61. 1-43
- Lampel, K. A., S. P. Keasler y D. E. Hanes. 1996. Specific detection of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. *Epidemiology and infection* 116:137-145.
- Larsen, J. C., J. Hunt, I. Perrin y P. Ruckebauer. 2004. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters* 153:1-22.
- Lay, D. C., Jr., R. M. Fulton, P. Y. Hester, D. M. Karcher, J. B. Kjaer, J. A. Mench, B. A. Mullens, R. C. Newberry, C. J. Nicol, N. P. O'Sullivan y R. E. Porter. 2011. Hen welfare in different housing systems. *Poultry Science* 90:278-294.
- Liao, C. H. y W. F. Fett. 2003. Isolation of *Salmonella* from alfalfa seed and demonstration of impaired growth of heat-injured cells in seed homogenates. *International Journal of Food Microbiology* 82:245-253
- Liljebjelke, K. A., C. L. Hofacre, T. Liu, D. G. White, S. Ayers, S. Young y J. J. Maurer. 2005. Vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production system. *Foodborne Pathogens and Disease* 2:90-102.

- Lim, Y. H., K. Hirose, H. Izumiya, E. Arakawa, H. Takahashi, J. Terajima, K. Itoh, K. Tamura, S. I. Kim y H. Watanabe. 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56:151-155.
- 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.
- Löfstrom, C., R. Knutsson, C. E. Axelsson y P. Radstrom. 2004. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology* 70:69-75.
- Logue, C. M., J. S. Sherwood, P. A. Olah, L. M. Elijah y M. R. Dockter. 2003. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *Journal of Applied Microbiology* 94:16-24.
- Lötzsch, R., Leistner, L. 1976. Aflatoxin-Rueckstaende in Huehnereiern und Eiprodukten. *Fleischwirtschaft* 12:1777-1785.
- Love, B. C. y M. H. Rostagno. 2008. Comparison of five culture methods for *Salmonella* isolation from swine fecal samples of known infection status. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:620-624
- Mac Faddin, J. F. 1980. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Maciel, B. M., J. C. Dias, C. C. Romano, N. Sriranganathan, M. Brendel y R. P. Rezende. 2011. Detection of *Salmonella* Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. *Genetics and Molecular Research* 10:2578-2588.
- Maciorowski, K. G., P. Herrera, M. M. Kunderinger y S. C. Ricke. 2006. Animal Feed Production and Contamination by Foodborne *Salmonella*. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1:197-209
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard y I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72:107-113.
- Mahe, A., S. Bougeard, A. Huneau-Salaun, S. Le Bouquin, I. Petetin, S. Rouxel, F. Lalande, P. A. Beloecil y N. Rose. 2008. Bayesian estimation of flock-level sensitivity of detection of *Salmonella* spp., Enteritidis and Typhimurium according to the sampling procedure in French laying-hen houses. *Preventive Veterinary Medicine* 84:11-26

- Mair, G., K. Lamelas y G. Beczkowski. 2012a. Boletín avícola: anuario 2011. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca 64:1-31.
- Mair, G., K. Lamelas y G. Beczkowski. 2012b. Boletín avícola. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca.
- Mallmann, C. A., P. Dilkin, L. Zanini Giacomini, R. Hummes Rauber. y C. E. Pereira. 2007. Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Porto Alegre. Brasil.
- Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge y R. Helmuth. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Applied and Environmental Microbiology 69:290-296.
- Malorny, B. y J. Hoorfar. 2005. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs. Journal of Clinical Microbiology 43:3033-3037
- Marth, E.H. 1990. Foodborne Diseases. D.O. Cliver ed. Academic Press, Inc. San Diego.
- Martin, S. W. 1977. The evaluation of tests. Canadian Journal of Comparative Medicine 41:19-25.
- Martinez-de-Anda, A., A. G. Valdivia, F. Jaramillo-Juarez, J. L. Reyes, R. Ortiz, T. Quezada, M. C. de Luna y M. L. Rodriguez. 2010. Effects of aflatoxin chronic intoxication in renal function of laying hens. Poultry Science 89:1622-1628.
- Mateu, E. y Casal, J. 2003. Tamaño de la muestra. Revista de Epidemiología y Medicina Preventiva 1:8-14.
- Matlho, G., S. Himathongkham, H. Riemann y P. Kass. 1997. Destruction of *Salmonella* enteritidis in poultry feed by combination of heat and propionic acid. Avian Diseases 41:58-61
- Mattick, K. L., J. D. Legan, T. J. Humphrey y M. Peleg. 2001. Calculating *Salmonella* inactivation in nonisothermal heat treatments from isothermal nonlinear survival curves. Journal of Food Protection 64:606-613.
- Matulova, M., H. Havlickova, F. Sisak y I. Rychlik. 2012. Vaccination of chickens with *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Vaccine 30:2090-2097.
- MERCOSUR. Reglamentación 25/02
http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_025_002_RTM_Aflatoxinas%20en%20Lech-Man%C3%AD-Ma%C3%ADz_Acta%202_02.PDF
- Mercado, E. C. 1983. *Salmonella* en pollos eviscerados provenientes de plantas procesadoras del gran Buenos Aires. Revista Argentina de Microbiología 15:13-28.
- Merck. 2005. Microbiology Manual. 12 th Edition.

- Messens, W., K. Grijspeerdt y L. Herman. 2006. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *World's Poultry Science Journal*. 61:71-85.
- Michanie, S. 2006. La bacteria que aun nos mantiene en vilo. *Enfasis Alimentación* 6:50-58.
- Micco, C., C. Brera, M. Miraglia y R. Onori. 1987. HPLC determination of the total content of aflatoxins in naturally contaminated eggs in free and conjugate forms. *Food Additives and Contaminants* 4:407-414.
- Mikołajczyk, A. y M. Radkowski. 2002. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plants in Poland. *Journal of Food Protection* 65:1475-1479.
- Miles, A. A., S. S. Misra y J. O. Irwin. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene (Lond)* 38:732-749
- Miles, R. D. y P. J. Jacob. 2000. Feeding the Commercial Egg-Type Laying Hen. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/ps/ps04700.pdf>. Acceso Junio 2012.
- Miller, R. G., C. R. Tate, E. T. Mallinson y J. A. Scherrer. 1991. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poultry Science* 70:2429-2432.
- Miller, R. G. y E. T. Mallinson. 2000. Improved detection of nontyphoid and typhoid *Salmonellae* with balanced agar formulations. *Journal of Food Protection* 63:1443-1446.
- Miraglia, M., B. De Santis, V. Minardi, F. Debegnach y C. Brera. 2005. The role of sampling in mycotoxin contamination: an holistic view. *Food Additives and Contaminants* 22 Suppl 1:31-36.
- Miyahara, M., M. Taguchi, M. Kanki, A. Kai, T. Ishihara, H. Kimata, A. Gunji y T. Tsukamoto. 2010. A collaborative study on a method to detect *Salmonella* in food. *Biocontrol Science* 15:69-73.
- Mogenedi, K.L.M., E.M.A. Goyvaerts, S.N. Venter y M.M. Sibara. 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.
- Mølbac, K., J. E. Olsen y H. C. Wegener. 2006. *Salmonella* infections. Páginas 57-155 en: *Foodborne Infections and Intoxications*. H. P. Rieman y D. O. Cliver eds., España.
- Mollenhorst, H., C. J. van Woudenberg, E. G. Bokkers y I. J. de Boer. 2005. Risk factors for *Salmonella* enteritidis infections in laying hens. *Poultry Science* 84:1308-1313.
- Moriñigo, M.A., M.A. Muñoz, E. Martínez-Manzanares, J.M. Sanchez, y J.J. Borrego. 1993. Laboratory study of several enrichment broths for the detection of *Salmonella* spp. particularly in relation to water samples. *Journal of Applied Bacteriology*.74:330-335.

- Muñoz Benito, M. 2011. Aseguramiento de la calidad de los resultados: control de calidad interno en el Laboratorio de ensayos fisicoquímicos. VI Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios.
- Murakami, K., K. Horikawa, T. Ito y K. Otsuki. 2001. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. *Epidemiology and Infection* 126:159-171.
- Murase, T., K. Senjyu, T. Maeda, M. Tanaka, H. Sakae, Y. Matsumoto, Y. Kaneda, T. Ito y K. Otsuki. 2001. Monitoring of chicken houses and an attached egg-processing facility in a laying farm for *Salmonella* contamination between 1994 and 1998. *Journal of Food Protection* 64:1912-1916.
- Murray, C.J. 1991. Salmonellae in the environment. *Rev. Sci. Tech.* 10: 765–785.
- Myint, M.S., Y.J. Johnson, N.L. Tablante, and R.A. Heckert. 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 Microbiology* 23: 599-604.
- Namata, H., E. Meroc, M. Aerts, C. Faes, J. C. Abrahantes, H. Imberechts y K. Mintiens. 2008. *Salmonella* in Belgian laying hens: an identification of risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 83:323-336
- OIE 2008. Manual de la OIE sobre los animales terrestres http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf. Acceso Enero 2012.
- OIE 2012. Terrestrial Manual. http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.03.11_fowl_typhoid.pdf. Acceso Enero 2012.
- Okamura, M., Y. Kamijima, T. Miyamoto, H. Tani, K. Sasai y E. Baba. 2001. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases* 45:61-69.
- Oikonomou, I., K. Halatsi, and A. Kyriacou. 2007. Selective PCR: a novel internal amplification control strategy for enhanced sensitivity in *Salmonella* diagnosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 456–461.
- Oliveira, C. A., E. Kobashigawa, T. A. Reis, L. Mestieri, R. Albuquerque y B. Correa. 2000. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants* 17:459-462

- Omwandho, C. O. A. y T. Kubota. 2010. *Salmonella* entericaserovar Enteritidis: a mini-review of contamination routes and limitations to effective control. Japan Agricultural Research Quarterly 44:7-16.
- Oliveira, S., L.R. Santos, D.M.T. Schuch, A. B. Silva, C.T.P. Salle y C.W. Canal. 2002. Detection and identification of salmonelas from poultry-related samples by PCR. Veterinary Microbiology 87:25-35.
- Orr, B.B. y E.N. Moore. 1953. Longevity of *Salmonella Gallinarum*. Poultry Science 32:800-805.
- Pascale, M., V. Gonnier y C. Jez. 2011. Situación, perspectivas y retos para los sectores europeos del huevo a las puertas del 2012. Selecciones avícolas. 18:17-23.
- Pattinson, M. 2008. Poultry diseases. 6ª ed. Elsevier Health Sciences.
- Peleg, M. y M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38:353-380.
- Perez, C. M., M.M. Sanchez, S. Henao, N.M. Cardona-Castro. 2008. Standarization of two Polymerase chain reaction test for the diagnosis of *Salmonella enterica* subespecie *enterica* in eggs. Archivos de Medicina Veterinaria 40: 235-242.
- Petersen, L. 1997. A comparison of EF-18 agar and modified brilliant green agar with lutensit for isolation of *Salmonella* from poultry samples. Acta Veterinaria Scandinavica 38:79-85.
- Pfeiffer, D. 2010. Veterinary Epidemiology. An Introduction. Jhon Wiley & Sons.
- Pires Rosa, A. y J.M. Santurio. 2005. Mycotoxins on poultry production. http://www.veterinertavukculuk.org/uploadimg/dosyalar/2005_istanbul/keynotes/rosa.pdf. Acceso Junio 2012.
- Pont, S. 2008. Sistemas agroalimentarios: ovícola argentino. http://www.produccion-Animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/77-ovicola.pdf Acceso Junio 2012.
- Poppe, C., R. J. Irwin, S. Messier, G. G. Finley y J. Oggel. 1991. The prevalence of *Salmonella* enteritidis and other *Salmonella* sp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. Epidemiology and Infection 107:201-211.
- Poppe, C., R. P. Johnson, C. M. Forsberg y R. J. Irwin. 1992. *Salmonella* enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. Canadian Journal of Veterinary Research 56:226-232.
- Poppe, C., E. D. Mann, S. Shaw, D. Warburton y A. Sewell. 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.
- Proux, K., F. Humbert, E. Jouy, C. Houdayer, F. Lalande, A. Oger y G. Salvat. 2002. Improvements required for the detection of *Salmonella Pullorum* and *Gallinarum*. Canadian Journal of Veterinary Research 66:151-157

- Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. Curtiss, 3rd y C. L. Gyles. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6:271-279.
- Rauber, R. H., P. Dilkin, A. O. Mallmann, A. Marchioro, C. A. Mallmann, A. Borsoi y V. P. Nascimento. 2012. Individual and combined effects of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide and fumonisin B₁ in broiler chickens. *Poultry Science* 91:2785-2791.
- Rawal, S., J. E. Kim y R. Coulombe, Jr. 2010. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science* 89:325-331.
- Rice, E.W., R.B. Baird, A.D. Eaton, and L.S. Clesceri. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation.
- Richard, J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119:3-10.
- Robens, J. F. y J. L. Richard. 1992. Aflatoxins in animal and human health. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 127:69-94.
- Rose, N., F. Beaudeau, P. Drouin, J. Y. Toux, V. Rose y P. Colin. 1999. Risk factors for *Salmonella* enterica subsp. enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 39:265-277.
- Rybolt, M.L., R.W. Wills, J.A. Byrd, T.P. Doler, and R.H. Bailey. 2004. Comparison of four *Salmonella* isolation techniques in four different inoculated matrices. *Poultry Science*. 83:1112-1116.
- Safarik, I., M. Safarikova y S. J. Forsythe. 1995. The application of magnetic separations in applied microbiology. *The Journal of Applied Bacteriology* 78:575-585.
- Salomonsson, A.-C., A. AspÁN, S. Johansson, A. Heino y P. E. R. HÄGgblom. 2005. *Salmonella* detection by polymerase chain reaction after pre-enrichment of feed samples. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 13:96-110
- Salwa, A. y W. Anwer. 2009. Effect of Naturally Contaminated Feed with Aflatoxins on Performance of Laying Hens and the Carryover of Aflatoxin B Residues in Table Eggs *Pakistan Journal of Nutrition*:181-186
- Sandoval, V. E., H. R. Terzolo, A. R. Moreira, G. L. Micheo, T. Eiguer, M. I. Caffer y B. Fronchkowsky. 1989. Paratifosis aviaria causada por *Salmonella* serovar Enteritidis en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal* 4:295-308.
- Santos Chona, O.M. 1999. Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los Seres humanos. <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/e/fulltext/aflatoxi/aflatoxi.pdf>. Acceso Junio 2012.

- Schell, H., A. M. Cislighi y D. Bujía. 2008. Información de la actividad avícola en Entre Ríos. Subsecretaría de la producción. Dirección General de Ganadería y Avicultura.
- Schell, H. L., M. L. Cumini y D. Bujía. 2010. Información de la Actividad Avícola en Entre Ríos 2010. Ministerio de Producción de la Provincia de Entre Ríos.
- Schoenhard, D. E. y H. J. Stafseth. 1953. Growth curves of *Salmonella* pullorum in different media. *Journal of Bacteriology* 65:69-74.
- Schulz, J., S. Van Hoorebeke, B. Hald, J. Hartung, F. Van Immerseel, I. Radtke, S. Kabell y J. Dewulf. 2011. The dynamics of *Salmonella* occurrence in commercial laying hen flocks throughout a laying period. *Avian Pathology* 40:243-248
- Scussel, V. M. 2003. Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M1 in milk and B1 in eggs. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23:46-52.
- SENASA 1997. Resolución Nro. 614/1997. http://www.entrierios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVI CULTURA/LEGISLACION/resolucion_n614-1997.pdf. Acceso Enero 2013.
- SENASA. 2002. Plan Nacional de Sanidad Avícola.
- SENASA 2010. Resolución 542/2010. http://www.entrierios.gov.ar/minpro/userfiles/files/PRODUCCION%20ANIMAL/AVI CULTURA/LEGISLACION/Res_senasa_542_10_1.pdf. Acceso Enero 2013
- Setta, A., P. A. Barrow, P. Kaiser y M. A. Jones. 2012. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF-kappaB signalling and cell cytotoxicity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 146:212-224.
- Sherry, A. E., M. F. Patterson y R. H. Madden. 2004. Comparison of 40 *Salmonella* enterica serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology* 96:887-893.
- Shephard, G. S. 2008. Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews* 37:2468-2477.
- 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.
- Sims, L. D. 2007. Risks associated with poultry production systems. *Asia Pacific Veterinary Information Services*.

- Singer, R. S., A. E. Mayer, T. E. Hanson y R. E. Isaacson. 2009. Do microbial interactions and cultivation media decrease the accuracy of *Salmonella* surveillance systems and outbreak investigations? *Journal of Food Protection* 72:707-713.
- Snow, L. C., R. H. Davies, K. H. Christiansen, J. J. Carrique-Mas, A. J. Cook y S. J. Evans. 2010. Investigation of risk factors for *Salmonella* on commercial egg-laying farms in Great Britain, 2004-2005. *Veterinary Record* 166:579-586.
- Soria, M. A. 2012. Presencia de *Salmonella* y características físicas de huevos destinados a consumo humano. *Master Scientiae* en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe.
- Soria, M. A., M. C. Soria y D. J. Bueno. 2012. A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction for *Salmonella* detection in egg content. *Poultry Science* 91:2668-2676.
- Soriano del Castillo, J. 2007. Micotoxinas en alimento. Díaz de Santos. España.
- Speers, G. M., R. A. Meronuck, D. M. Barnes y C. J. Mirocha. 1971. Effect of feeding *Fusarium roseum* F. Sp. *graminearum* contaminated corn and the mycotoxin F-2 on the growing chick and laying hen. *Poultry Science* 50:627-633.
- Stoloff, L. y M. W. Trucksess. 1978. Survey for aflatoxin B1 in chicken eggs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 61:995-996
- Su, L. H. y C. H. Chiu. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*. 30:210-219.
- Tarabla, H. D. 2000. *Epidemiología Diagnóstica*. I. Tosti ed. Centro de Publicaciones, Secretaría de Extensión UNL, Santa Fe, Argentina.
- Tate, C. R., R. G. Miller, E. T. Mallinson, L. W. Douglass y R. W. Johnston. 1990. The isolation of *Salmonellae* from poultry environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. *Poultry Science* 69:721-726.
- Tennant, S. M., S. Diallo, H. Levy, S. Livio, S. O. Sow, M. Tapia, P. I. Fields, M. Mikoleit, B. Tamboura, K. L. Kotloff, J. P. Nataro, J. E. Galen y M. M. Levine. 2010. Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Neglected Tropical Disease* 4:e621
- Terrera, M. V. 2012. Situación sanitaria de la avicultura comercial en la Argentina <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3747-final.pdf>. Acceso Diciembre 2012.
- Terzolo, H. R. 1980. Infecciones paratifoideas o salmonelosis. Reunión sobre producción avícola de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). *Orientación Avícola* 61:58-59.
- Terzolo, H. 2008. Estrategias en Salmonelosis de las aves: Dónde estamos y hacia dónde deberíamos ir.

<http://www.cadenaavicola.com.ar/Adjuntos/AMEVEA2008/TerzoloFinal.doc>. Acceso Enero 2013.

- Terzolo, H. R. Bacteriological study of avian salmonellosis (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) in Latin America. Seminario Internacional de Salmonellosis aviar.
- Thrusfield, M. (1990). Epidemiología Veterinaria. Butetrwhorths & Co. (Eds). London WC2B 6AB. 14: 191-205.
- Trafny, E. A., K. Kozłowska y M. Szpakowska. 2006. A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in human faeces. Letters of Applied Microbiology 43:673-679.
- Trucksess, M. W., L. Stoloff, K. Young, R. D. Wyatt y B. L. Miller. 1983. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. Poultry Science 62:2176-2182.
- Trucksess, M. W. y L. Stoloff. 1984. Determination of aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 67:317-320.
- Trucksess, M. W. 2008. Thin layer chromatography in micotoxins analysis in Mycotoxin contamination and control. H. Njapau, S. Trujillo, A. E. Pohland y D. L. Park eds. Henry Njapau, Bloomington, Indiana. USA.
- Tunes, M. y G. B. Vigo. 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.
- UE. 2011. Reglamento N° 517/2011 Diario Oficial de la Unión Europea 138:45-51.
- USDA. 2000. NAHMS Layers '99 *Salmonella enterica* sero-type Enteritidis in table egg layers in the U.S. Acceso Octubre 2012
- USDA. 2005. Distribution of *Salmonella* prevalence in hens and eggs. http://www.fsis.usda.gov/PDF/SE_Risk_Assess_Annex_B_Oct2005.pdf
- USDA, 2006. Biosecurity guide for poultry and birds owners. http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/poultry/downloads/layers99/Layers99_dr_Salmonella.pdf. Acceso Diciembre 2012
- van Boekel, M. A. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74:139-159.
- Van der Zee, H. 2003. Media for the isolation of *Salmonella* spp. Páginas 195-210 en Handbook of culture media for food microbiology. J. E. L. Corry, G. D. W. Curtis y R. M. Baird eds. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Van Hoorebeke, S., F. Van Immerseel, J. Schulz, J. Hartung, M. Harisberger, L. Barco, A. Ricci, G. Theodoropoulos, E. Xylouri, J. De Vylder, R. Ducatelle, F. Haesebrouck, F. Pasmans, A.

- de Kruif y J. Dewulf. 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 Hoorebeke, S. 2010. The effect of different housing systems on *Salmonella* and antimicrobial resistance in laying hens.
http://www.rohh.ugent.be/v2/pages/doctoral_theses/2010/VanHoorebeke_S.pdf
Acceso Junio 2012
- Van Immerseel, F., J. Dewulf; R. Raspoet, F. Haesebrouck y R. Ducatelle. 2010. Pathogenesis of egg contamination and risk factors for *Salmonella* transmission in laying hens.
<http://www.abef.com.br/seminario/008.pdf>. Acceso Diciembre 2012
- van Schothorst, M., F. M. van Leusden, J. Jeunink y J. de Dreu. 1977. Studies on the multiplication of salmonellae in various enrichment media at different incubation temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 42:157-163
- Varsavsky, E., E. P. de Banchero, M. A. Sala de Miguel y R. Cantoni. 1979. Determination of aflatoxins and toxicogenic fungi in mixed feed for poultry. *Revista Argentina de Microbiología* 11:108-113.
- Velilla, A., H.R. Terzolo y S. Feingold. 2004. Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella*. PCR aplicada a la avicultura y a la microbiología de los alimentos. <http://www.vet-uy.com/articulos/avicultura/050/015/avic015.htm>. Acceso Diciembre 2012
- Velilla, A., H. Terzolo y S. Feingold. 2006. Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella*. *Mundo Lácteo y Carnico*:18-20.
- Venturino, J. 2006. Bioseguridad en Granjas Avícolas. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/34-bioseguridad.pdf. Acceso Enero 2013.
- Viora, S., R. Anselmo, H. Barrios y M. D. Franceschi. 1993. *Salmonella enteritidis* en maples. *Revista de Medicina Veterinaria* 74:96-99.
- Voogt, N., M. Raes, W. J. Wannet, A. M. Henken y A. W. van de Giessen. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters of Applied Microbiology* 32:89-92.
- Waldroup, A. L., P. W. Waldroup y E. R. Johnson. 1997. Development and evaluation of a rapid test procedure to detect salmonellae in feed ingredients and finished feeds. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*:151-167

- Waltman, W. D., A. M. Horne y C. Pirkle. 1993. Influence of enrichment incubation time on the isolation of *Salmonella*. *Avian Disease* 37:884–887.
- Waltman, D. W. y R. K. Gast. 2008. *Salmonellosis. A Laboratory Manual for the isolation and identification of Avian Pathogens*, 5th. American Association of Avian Pathologists eds. Athens, Georgia, USA.
- Wang, Y. C., J. L. Deng, S. W. Xu, X. Peng, Z. C. Zuo, H. M. Cui, Y. Wang y Z. H. Ren. 2012. Effects of zearalenone on calcium homeostasis of splenic lymphocytes of chickens in vitro. *Poultry Science* 91:1956-1963.
- Wattiau, P., C. Boland y S. Bertrand. 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology* 77:7877-7885.
- Wilber, H. y M. Rodríguez. 2010. Micotoxinas y aflatoxina B₁, un problema en salud animal. *Revista Teoría y Praxis Investigativa* 5:71-78
- Whelan, M., B. Kinsella, A. Furey, M. Moloney, H. Cantwell, S. J. Lehotay y M. Danaher. 2010. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *Journal of Chromatography A* 1217:4612-4622.
- Whitaker, T. B. 2006. Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 23:50-61.
- WHO. 2002. *Global Strategy for Food Safety: safer food for better health*. WHO, Geneva, Switzerland.
- Wolzak, A., A. M. Pearson, T. H. Coleman, J. J. Pestka y J. I. Gray. 1985. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food Chem Toxicol* 23:1057-1061.
- Wilber, H. y M. Rodríguez. 2010. Micotoxinas y Aflatoxina B₁, un problema en salud animal. *Revista Teoría y Praxis Investigativa* 5:71-78.
- Williams, J. E. 1981. Salmonellas in poultry feeds—A worldwide review. *World's Poultry Science Journal* 37:6–25
- Wilson, J. M., and R. Davies. 1976. Minimal medium recovery of thermally injured *Salmonella* Senftenberg 4969. *Journal of Applied Bacteriology* 40:365-374.
- Windhorst, H. W. 2008. *A Projection of the Regional Development of Egg production until 2015*. IEC Special Report April London.
- Windhorst, H. W. 2011. *Visión general del sector del huevo*. http://www.cicei-project.eu/es/?page_id=206. Acceso Diciembre de 2012
- Wolfenden, R. E., S. L. Layton, A. D. Wolfenden, A. Khatiwara, G. Gaona-Ramirez, N. R. Pumford, K. Cole, Y. M. Kwon, G. Tellez, L. R. Bergman y B. M. Hargis. 2010.

- Development and evaluation of candidate recombinant *Salmonella*-vectored *Salmonella* vaccines. *Poultry Science* 89:2370-2379.
- Wolzack, A., A. M. Pearson, T. H. Coleman, J. J. Pestka y J. I. Gray. 1985. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food and Chemical Toxicology* 23:1057-1061.
- Wu, F. 2004. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environmental Science & Technology* 38:4049-4055.
- Yuño, M. M. I., H. R. Terzolo, H. D. Fernandez, R. C. Malena y M. E. Altuna. 1995. Evaluación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Salmonella* en producción avícola. *Revista Argentina de Microbiología* 27:57-69.
- Zaghini, A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli y L. Rizzi. 2005. Mannanligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver. *Poultry Science* 84:825-832.
- Zhang, W., J. X. Zheng y G. Y. Xu. Toward better control of *Salmonella* contamination by taking advantage of the egg's self-defense system: a review. *Journal of Food Science* 76:76-81
- Zhao, S., P. F. McDermott, S. Friedman, J. Abbott, S. Ayers, A. Glenn, E. Hall-Robinson, S. K. Hubert, H. Harbottle, R. D. Walker, T. M. Chiller y D. G. White. 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:106-117.
- Zheng, M. Z., J. L. Richard y J. Binder. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161:261-273