



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**

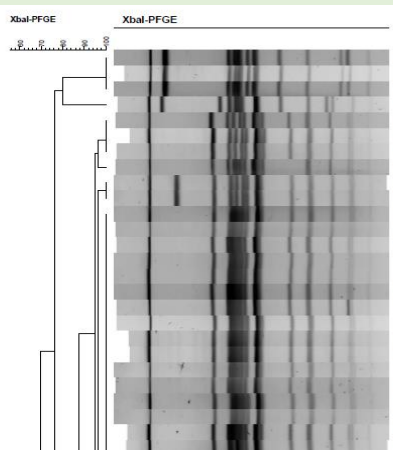
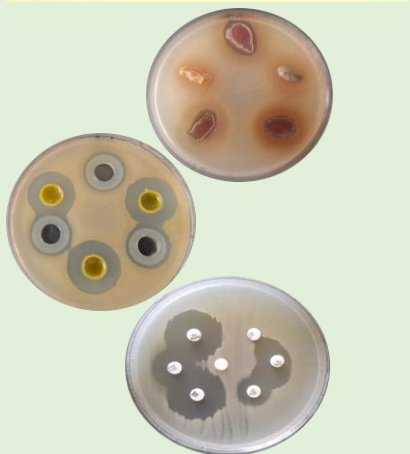
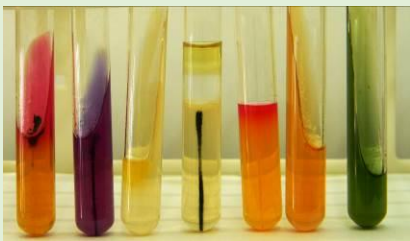
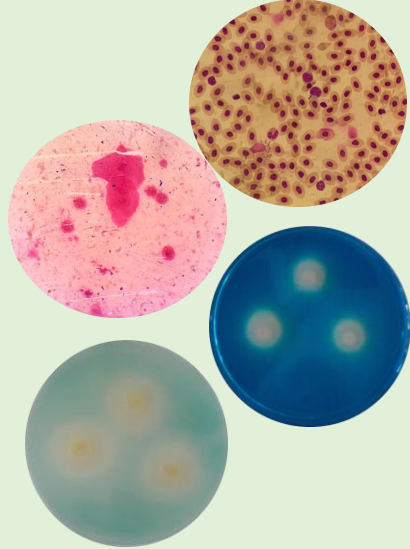
**TESIS DE DOCTORADO EN
CIENCIAS VETERINARIAS**

**“SEROVARIETADES DE *Salmonella sp.*
EN BROTES DE TIFOSIS AVIAR
OCURRIDOS EN PONEDORAS
COMERCIALES”**

M. Sc. Bioqco.

MARIO ALBERTO SORIA

-2021-





UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias
**“SEROVARIEDADES DE *Salmonella* SP. EN BROTES DE TIFOSIS
OCURRIDOS EN PONEDORAS COMERCIALES”**

Autor: M. Sc. Bioqco. Mario Alberto Soria

Director: Dr. Dante Javier Bueno

Co-director: Dra. Lucía Galli

Lugar/es de trabajo:

Laboratorio de Sanidad Aviar, INTA-EEA Concepción del Uruguay.
Laboratorio de Seguridad Alimentaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP,
IGEVET-CONICET.

2021

JURADOS

Dra. María Ines Caffer

Dra. Nora Lía Padola

Dr. Raúl Cerda

A mis padres Tere y Luis

A toda mi familia

A la memoria de Mercedes “Mechita” Martinelli



*“No hay fácil ni difícil,
fácil es lo que ya sabemos hacer,
difícil, lo que aún no hemos aprendido a hacer bien”*

Bernardo Houssay

Agradecimientos

A **Dios**, por darme las fuerzas necesarias para poder lograr mis metas.

A mis papás **Tere y Luis**, quienes siempre confiaron en mí, que con sus incansables consejos hicieron de mí, la persona que soy. ¡Gracias por sus ejemplos de constancia, dedicación y fortaleza!

Al **Dr. Dante J. Bueno**, director de este trabajo de tesis, por confiar en mí, por brindarme sus conocimientos y el apoyo necesario para poder concluir esta etapa.

A la **Dra. Lucía Galli**, codirectora de este trabajo de tesis, por brindarme su ayuda, tiempo, apoyo y dedicación.

Al **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)** por brindarme una beca que me dio el apoyo económico durante estos años.

A los Med. Vet. **Eduardo Godano** y **Leonardo Leiva** por su colaboración durante los muestreos de granjas, por su amistad y predisposición para todas mis consultas.

A las Dras. **Alejandra Londero** y **Magdalena Costa** del laboratorio de Seguridad Alimentaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, IGEVET-CONICET. Gracias por el tiempo y amistad brindada mientras he trabajado con Uds.

A la Dra. **Cecilia Rodríguez**, mi amiga, por brindarme sus conocimientos en los estudios de mecanismos de resistencia a los antibióticos. ¡Gracias nenis por tu tiempo!

Al Sr. **Asdrúbal Corbalán** por estar siempre y acompañarme. Gracias por darme siempre aliento para terminar este trabajo.

A mis antiguos compañeros, pero grandes amigos, del laboratorio **Carolina G., Francisco P., Francisco R.**, para los que siguen **Florencia R.** y para los nuevos **Magali H., Yamila C. y Johanna M.**

Al laboratorio de Producción de Antígenos y antisueros, ANLIS, Instituto Carlos G. Malbrán por haberme acompañado y orientado con las serotipificaciones de las cepas de *Salmonella* sp. Gracias **Susana, Ariel** y **Valeria**. Gracias a los demás integrantes del laboratorio **Ale, Rita, Gime, Claudia** y **Tere**.

A las Dras. **Cecilia Soria** y **Carolina Espeche**, mis amigachas, por alentarme desde el comienzo en esta nueva etapa de mi vida.

A mis hermanos **Silvio, César, Rodrigo y Pedro** y sobrinos **Facundo, Lucía, Ignacio, Lautaro, Agustina, Irina, Katerina**, por brindarme su apoyo incondicional siempre y a los mas pequeños de la familia **Priscilla, Roman y Aynara**.

A todos mis amigos de la infancia **Carla, Diego, Joel, Silvia, Vero, Valeria y Yanina**, por estar siempre presentes brindándome su amistad desinteresadamente

A mis amigos de Concepción del Uruguay, **Ale, Fafa, Gaby, Diego, Mariela, Andreita, Nancy, Susana, Fernanda, Sonia** quienes siempre han estado al lado mio en estos años.

A mis amigos **Malvina, Andrés, Lidia “Muni”, Susana**, y a todas aquellas personas que han pasado y están conmigo compartiendo mi vida, y que, sin saberlo, también han ayudado con la finalizacion de este trabajo de tesis.

Un agradecimiento especial a mi amiga **Mercedes “Mechita” Martinelli** quien nos dejó este año. Gracias por tus incansables palabras de aliento cada vez que las he necesitado, gracias por tu gran **AMISTAD**. He sido bendecido el poder conocerte, te quiero y ¡te extraño! Hoy, aquí escribiendo el formato final de mi tesis recuerdo la pregunta que siempre me hacías cada vez que nos veíamos: “Y... Topita ¿Cómo vas con la tesis?”

Dictamen del jurado

Doctorado en
Ciencias Veterinarias
Secretaría de **POSGRADO**



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

*Ref. Expediente N°0600-941/14 – Soria, Mario A.
Acta 220-2021*

Siendo las 11:05 horas del día martes 24 del mes de agosto del año 2021, comienza la defensa oral y pública del Trabajo de Tesis Doctoral del **Bioq., M.Sc., Mario Alberto Soria** titulado “**Serovariedades de Salmonella sp. en brotes de tifosis ocurridos en ponedoras comerciales**”, dirigido por el Doctor Dante Javier Bueno y codirigido por la Doctora Lucía Galli.

Para ello se reúnen en a través de videoconferencia debido a la situación de emergencia sanitaria que transita nuestra Universidad (amparado por Resolución 667/20 y ampliatorias; y Ordenanza de Posgrado 261/19, artículo 54 y Resolución Ministerial 160/11, artículo 8), las Señoras Profesoras Doctoras María Inés Caffer (INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán") y Nora Lía Padola (Facultad de Ciencias Veterinarias – UNCPBA) y el Señor Doctor Raúl Oscar Cerdá (Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP) integrantes del Jurado encargado de dictaminar sobre la aceptación o rechazo del mencionado Trabajo de Tesis. Como así también Director, Codirectora, Tesista y el Secretario de Posgrado Doctor Rodolfo Luzbel de la Sota, quien dará fe de la presencia virtual de las intervenciones remotas.

Luego de deliberar sobre el trabajo presentado para acceder al título de Doctor en Ciencias Veterinarias, el Jurado **resolvió**:

El doctorando ha realizado un trabajo de tesis original e innovador que aporta información inédita en cuanto a seroprevalencia de Salmonella en brotes de tifosis en ponedoras comerciales. Cabe destacar la gran cantidad de información generada en cuanto a la caracterización, al estudio de los factores de riesgo, y el estudio de los factores de RAM en salmonelas móviles y no móviles/tíficas; y a que dos de los hallazgos más importantes fueron el aislamiento de la serovariedad gallinarum solamente de las aves agónicas como de las muertas, y que el 92% de las aislamientos fueron en aves no vacunadas.

Se destaca la realización de un trabajo adecuadamente planificado, dividido en diferentes estudios, bien concatenados, bien redactado y de lectura clara, utilizando una gran variedad de técnicas, análisis estadístico riguroso, discusión y conclusiones acordes con los resultados obtenidos.

La defensa oral del trabajo fue muy clara y didáctica, demostrando amplio dominio de la temática expuesta. El doctorando respondió en forma sólida y con solvencia las preguntas realizadas por el jurado.

*Ref. Expediente N°0600-004466/16-000-D'Francisco, Florencia A.
Acta 219-2021*

Doctorado en
Ciencias Veterinarias
Secretaría de **POSGRADO**



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Por todo lo expuesto, este Jurado considera en forma unánime una calificación de 10 (diez) sobresaliente.

Intervenciones remotas:

Dra. Ma. Inés Caffer, Jurado - INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

Dra. Nora L. Padola, Jurado - FCV-UNCPBA.

Dr. Raúl O. Cerdá, Jurado - FCV-UNLP

Dr. Dante J. Bueno, Director

Dra. Lucía Galli, Codirectora

Bioq. M.Sc. Mario Alberto Soria, Tesista

DE LA SOTA DE LA SOTA
Rodolfo Rodolfo Luzbel
Luzbel 2021.08.24
14:51:43 -03'00'

Ref. Expediente N°0600-004466/16-000-D'Francisco, Florencia A.
Acta 219-2021

Producción Científica

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

Trabajos publicados en revistas periódicas, libros o capítulos de libros:

- ✓ **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. 2019. *Salmonella* en la producción avícola de carne en la Argentina. La Alimentación Latinoamericana LI (342): 46-50.
- ✓ Margulis, J., **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. 2018. Planes Nacionales para el control de *Salmonella* en planteles de aves reproductoras de Argentina, Unión Europea y Estados Unidos. Negocios de Avicultura. 15 (79): 2-16.
- ✓ Bueno, D.J., Soria, M.C., **Soria, M.A.**, Procura, F., Rodriguez, F.I., Godano, E.I. 2017. Egg Production Systems and *Salmonella* in South America. pp. 87-110. Para libro: Producing safe eggs: microbial ecology of *Salmonella*. Editores: Steven C. Ricke and Richard K. Gast. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-802582-6.00006-9.
- ✓ **Soria, M.A.**, and Bueno D.J. 2015. Culture based Methods to Detect *Salmonella* from Different Poultry Products. pp: 57-86. Para: Food Microbiology: Fundamentals, Challenges and Health Implications. Ed: Elaine Perkins. Nova Science Publishers, New York.

Resúmenes presentados a congresos científicos de la especialidad

- ✓ **Soria, M.A.**, Galli, L., Londero, A., Bueno, D.J. Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR en cepas de *Salmonella* gallinarum biovar gallinarum aisladas en granjas con brotes de tifosis aviar de argentina. XV Congreso Argentino de Microbiología. 25-27 septiembre, 2019. CABA, Argentina. Aceptado como poster. Ref: JU 128.
- ✓ **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. Presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano en muestras de contenido de huevo y órganos de gallinas de postura con antecedentes de tifosis aviar. 1ª Conferência Conjunta sobre Investigaçãõ em Produtos Naturais E Avícolas. CYTED-CBIOS. Lisboa, Portugal. 8 al 9 de noviembre de 2018.
- ✓ **Soria, M.A.**, Ritú, G., Díaz, F., Bueno, D.J. Comparación de la sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* móviles aisladas en granjas con brotes de Tifosis Aviar y de pacientes humanos. II Congreso Internacional de Zoonosis IX Congreso Argentino de Zoonosis. Capital Federal, Buenos Aires, Argentina. 5 al 7 de junio de 2018.
- ✓ **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. Sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* Gallinarum aisladas en granjas con brotes de tifosis aviar. XVII Jornadas

Argentinas de Microbiología. Jornadas Bioquímicas del Sur Argentino. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. 7 al 8 de junio de 2017.

- ✓ **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. Sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* móviles e inmóviles aisladas en granjas con brotes de Tifosis Aviar. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. XIV Congreso ARGENTINO de Microbiología. IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos – CLAMME. Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis (SLAMTB). Rosario, Santa Fe, Argentina. Septiembre de 2016.
- ✓ **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. Presencia de Sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en muestras de contenido de huevo y órganos de gallina de postura con antecedentes de tifosis aviar. III Congreso bioquímico del Litoral. XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. Santa Fe, Argentina. 5 al 7 de agosto de 2015.
- ✓ **Soria, M.A.**, Bueno, D.J. Estudios de leucocitos en materia fecal, serología, parámetros bioquímicos y hematológicos en aves de postura con antecedentes de Tifosis aviar. 3º Congreso Bioquímico de Córdoba. Córdoba, Argentina. 3 al 5 de septiembre de 2015.
- ✓ **Soria, M.A.**, Gómez, S.C., Pulido, D., Bueno, D.J. Aislamiento de *Salmonella* Gallinarum en aves de postura y su relación con los pesos relativos de hígado y bazo. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba, Argentina. 14 al 16 de agosto de 2014.

INDICE GENERAL

PORTADA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DICTAMEN DEL JURADO	VI
PRODUCCION CIENTIFICA	IX
ÍNDICE GENERAL	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ABREVIATURAS	XXIII
RESUMEN / SUMMARY	XXIV
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Producción de huevo para consumo.	2
2. Aves de postura y sistemas de producción.	5
3. Riesgos sanitarios en granjas.	8
4. Género <i>Salmonella</i> .	8
4.1. Nomenclatura y taxonomía.	9
4.2. Hábitat.	10
4.3. Estructura antigénica.	11
4.4. Patogenicidad.	12
5. <i>Salmonella</i> y Salud Pública.	13
6. Salmonelosis en gallinas ponedoras.	16
6.2. Paratifosis aviar.	16
6.3. Tifosis aviar.	18
6.4. Patogenia de la infección en la salmonelosis aviar.	21
6.5. Formación del huevo e infección con <i>Salmonella</i> sp.	23
7. Detección de <i>Salmonella</i> en el laboratorio.	28
7.1. Método de cultivo bacteriológico.	29
7.1.1. Medios de cultivo para pre-enriquecimiento.	30
7.1.2. Medios de cultivo para enriquecimiento selectivo.	30
7.1.3. Agares selectivos-diferenciales.	32
7.1.4. Confirmación de género mediante pruebas bioquímicas.	34
7.1.5. Serotipificación.	37
7.1.6. Métodos rápidos.	37
7.1.7. Tipificación molecular.	39
7.1.8. Métodos serológicos.	41
8. Parámetros bioquímicos en infección por <i>Salmonella</i> biovar Gallinarum.	42
9. Leucocitos fecales.	43
10. Sensibilidad a los antimicrobianos.	44
10.1. Resistencia a antibióticos.	47
10.1.1. Resistencia a antibióticos β -lactámicos.	50
10.1.2. Resistencia a quinolonas.	51
11. Residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano (antimicrobianos).	52
12. Bioseguridad e identificación de factores de riesgo.	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
Hipótesis de trabajo.	58

Objetivo general.	58
Objetivos específicos.	58
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. Muestreo activo.	60
1.1. Características de las granjas muestreadas.	60
1.2. Tipos de muestras.	61
1.2.1. Alimento.	61
1.2.2. Huevos.	62
1.2.3. Guano/calza/nido.	62
1.2.4. Agua.	62
1.2.5. Aves agónicas sacrificadas.	63
1.2.5.1. Muestras de sangre.	63
1.2.5.2. Hisopados cloacales.	64
1.2.5.3. Órganos.	64
1.2.6. Aves muertas naturalmente.	64
1.3. Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp. en muestras provenientes del muestreo activo.	64
1.3.1. Alimento.	64
1.3.2. Huevos.	65
1.3.3. Guano/calza/nido.	65
1.3.4. Agua.	66
1.3.5. Hisopados cloacales.	66
1.3.6. Órganos de aves.	66
1.3.7. Caracterización fenotípica de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	67
1.3.7.1. Serotipificación.	67
1.3.7.1.1. Serotipificación somática.	67
1.3.7.1.2. Serotipificación Flagelar.	67
1.3.7.1.3. Inversión de fase.	68
1.3.8. Confirmación genotípica de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	68
1.3.8.1. Extracción de ADN.	68
1.3.8.2. PCR <i>Salmonella</i> sp.	69
1.3.8.3. PCR <i>Salmonella</i> Gallinarum biovar Gallinarum/Pullorum.	69
1.3.8.4. PCR <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis.	70
1.3.8.5. PCR <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium.	70
1.3.9. Análisis estadístico.	71
1.4. Relación de pesos de aves muertas naturalmente o sacrificadas / órganos (hígado y bazo).	71
1.5. Estudios de parámetros hematológicos, serológicos y presencia de leucocitos fecales en muestras provenientes de aves agónicas.	72
1.5.1. Recuento diferencial de leucocitos en sangre entera.	72
1.5.2. Parámetros bioquímicos.	72
1.5.3. Detección de <i>Salmonella</i> biovar Gallinarum mediante aglutinación rápida en placa (ARP).	73
1.5.4. Presencia de Leucocitos fecales (LF).	73
1.5.5. Análisis estadístico.	74
1.6. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano presentes en muestras de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.	74

1.6.1. Tipos de muestras.	74
1.6.2. Cepas utilizadas en el ensayo.	75
1.6.3. Ensayo para determinar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano.	75
1.6.4. Detección de sustancias inhibidoras presentes en huevo mediante kit comercial.	76
1.6.5. Detección de quinolonas presentes en huevo mediante kit comercial.	77
1.6.6. Análisis estadístico.	78
1.7. Evaluación de análisis de riesgo.	78
1.7.1. Diseño del cuestionario.	78
1.7.2. Procesado de los datos y Análisis estadístico.	78
2. Muestreo pasivo.	79
2.1. Muestras de aves.	79
2.2. Confirmación de <i>Salmonella</i> sp. provenientes de pacientes humanos.	80
3. Estudio de sensibilidad a antibióticos en cepas de <i>Salmonella</i> sp.	80
3.1. Caracterización fenotípica de la resistencia a diferentes antibióticos.	80
3.1.1. Antibióticos evaluados.	80
3.1.2. Prueba de sensibilidad a los antibióticos.	80
3.1.3. Determinación de co-resistencia.	81
3.1.4. Caracterización fenotípica de la presencia de enzimas betalactamasas (BL).	82
3.2. Caracterización genotípica de los mecanismos de resistencia de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	83
3.2.1. PCR para β -lactamasas tipo <i>bla</i> _{CTX-M2} .	83
3.2.2. PCR para los genes de resistencia a quinolonas y/o fluoroquinolonas <i>gyrA</i> y <i>qnrB</i> .	84
4. Subtipificación molecular de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	85
4.1. Extracción de ADN.	85
4.2. Reacción de ERIC-PCR en cepas de SG.	85
4.3. Reacción de PFGE en cepas de <i>Salmonella</i> sp.	85
4.4. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	87
RESULTADOS	88
1. Muestreo activo.	89
1.1. Caracterización de los galpones muestreados.	89
1.2. Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	89
1.2.1. Muestras ambientales.	90
1.2.2. Muestras de aves muertas.	93
1.2.2.1. Aves muertas naturalmente.	93
1.2.2.2. Aves agónicas sacrificadas.	95
1.3. Confirmación genotípica de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	99
1.4. Relación de pesos de aves muertas naturalmente o sacrificadas / órganos (hígado y bazo).	100
1.5. Parámetros hematológicos y bioquímicos de aves agónicas de galpones con antecedentes de TA.	101
1.5.1. Relación entre diferentes variables (aislamiento de <i>Salmonella</i> sp., ARP y LF) según la edad de las aves agónicas.	105

1.6. Evaluación de sustancias inhibidoras del crecimiento de <i>Salmonella</i> sp. presentes en diferentes muestras de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.	108
1.6.1. Número y tipo de muestra.	108
1.6.2. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> sp. en muestras de alimento, agua y guano.	109
1.6.3. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> sp. en muestras de hígado y bazo de aves muertas naturalmente y sacrificadas.	110
1.6.4. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> sp. presentes en muestras de Clara (CL) y Yema (Y).	111
1.6.5. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> sp. y residuos de quinolonas presentes en el contenido de huevo mediante kit ZEU Explorer y Equinox.	113
1.7. Identificación de factores de riesgo para <i>Salmonella</i> sp. en gallinas ponedoras con antecedentes de tifosis aviar.	115
2. Muestreo pasivo.	121
2.1. Muestras provenientes de aves.	121
2.2. Aislamiento y/o confirmación de <i>Salmonella</i> sp. provenientes de pacientes humanos y/o ambientes hospitalarios.	121
3. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en cepas de <i>Salmonella</i> sp.	122
3.1. Caracterización fenotípica de la resistencia a diferentes antibióticos.	124
3.2. Caracterización fenotípica de la presencia de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y caracterización molecular de β -lactamasas tipo CTX-M2 en cepas de <i>Salmonella</i> sp.	129
3.3. Caracterización fenotípica y genotípica de la presencia de genes de resistencia a quinolonas.	130
4. Subtipificación molecular de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp.	131
4.1. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp. mediante ERIC-PCR.	131
4.2. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp. mediante PFGE.	135
DISCUSIÓN	140
1. Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	141
2. Parámetros hematológicos y bioquímicos de aves agónicas de galpones con antecedentes de TA.	144
3. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano presentes en muestras de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.	148
4. Identificación de factores de riesgo para <i>Salmonella</i> sp. en gallinas ponedoras con antecedentes de tifosis aviar.	151
5. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en cepas de <i>Salmonella</i> sp.	154
6. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de <i>Salmonella</i> sp. mediante técnicas moleculares (ERIC-PCR y PFGE).	158
CONCLUSIONES FINALES	161
PROYECCIONES	165
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
ANEXO	212

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación entre <i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum y biovar Pullorum (Chacana y Terzolo, 2003).	9
Tabla 2. Número de especies, subespecies y serovariedades del género <i>Salmonella</i> (Issenhuth-Jeanjean y col., 2014).	10
Tabla 3. Número total, ubicación y características de los galpones muestreados en las granjas avícolas con antecedentes de brote de tifosis aviar.	61
Tabla 4. Cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas en el estudio de presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano.	75
Tabla 5. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb) del kit Explorer para diferentes antimicrobianos en huevos de gallina, según fabricante.	77
Tabla 6. Antibióticos evaluados frente a diferentes cepas de <i>Salmonella</i> sp.	82
Tabla 7. Caracterización de los galpones muestreados obtenidos a partir de la encuesta realizada durante el muestreo activo.	90
Tabla 8. Resultados obtenidos por aislamiento de <i>Salmonella</i> sp. en muestras de guano, calza, nido, alimento, agua y pooles de huevo provenientes de granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.	91
Tabla 9. Serovares de <i>Salmonella</i> tipo móvil en muestras de galpones con aves de postura con antecedentes de brotes de tifosis aviar de la provincia de Entre Ríos.	92
Tabla 10. Sensibilidad (Ser) y exactitud (EXAr) relativas y concordancia para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF18, MacConkey (MC) y <i>Salmonella-Shigella</i> (SS) utilizados en muestras ambientales provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.	93
Tabla 11. Resultados obtenidos por aislamiento de <i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum en muestras de aves muertas naturalmente provenientes de granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.	94
Tabla 12. Sensibilidad (Ser) y exactitud (EXAr) relativas y concordancia para los agares selectivos-diferenciales MacConkey (MC) y <i>Salmonella-Shigella</i> (SS) utilizados en muestras de órganos de aves muertas provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.	95
Tabla 13. Resultados obtenidos para el aislamiento de <i>Salmonella</i> Gallinarum biovar Gallinarum en muestras de aves agónicas sacrificadas provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.	97

- Tabla 14.** Concordancia (coeficiente Kappa y prueba de MacNemar) para el aislamiento de *Salmonella* sp. entre los diferentes tipos de muestras de aves agónicas de galpones con antecedentes de tifosis aviar. 98
- Tabla 15.** Sensibilidad (Ser) y exactitud (EXAr) relativas y concordancia para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF18, MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS) utilizados en las muestras de aves agónicas sacrificadas provenientes de granjas con antecedentes de brotes de tifosis aviar. 99
- Tabla 16.** Resultados de la PCR y serotipificación para los aislamientos obtenidos del muestreo activo en granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de brotes de tifosis aviar. SE= *S. ser. Enteritidis*, SG= *S. ser. Gallinarum* biovar *Gallinarum*, S.P=*S. ser. Gallinarum* biovar *Pullorum*. NR= no realizado. 100
- Tabla 17.** Recuento total de glóbulos blancos, porcentaje (%) diferencial de leucocitos y parámetros bioquímicos en suero de aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar según el aislamiento de SG y la presencia de LF. Los valores representan el promedio \pm desvío estándar. 102
- Tabla 18.** Recuento total de glóbulos blancos (mm³), porcentaje diferencial de leucocitos (%), y parámetros de bioquímica de suero en aves agónicas de acuerdo a la aglutinación rápida en placa (ARP). Los valores representan el promedio \pm DE. Suero diluido (1:8) con solución fisiológica. 104
- Tabla 19.** Concordancia (coeficiente Kappa y prueba de McNemar) para la aglutinación rápida en placa (ARP), presencia de leucocitos fecales (LF) entre las diferentes muestras tomadas para el aislamiento de *Salmonella ser. Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG) a partir de aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar. 105
- Tabla 20.** Recuento total de glóbulos blancos (mm³), porcentaje diferencial de leucocitos (%) y valores de bioquímica de suero en aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar, según la edad de las aves y el aislamiento de *Salmonella ser. Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG). Los valores representan el promedio \pm DE. 106
- Tabla 21.** Recuento total de glóbulos blancos, porcentaje diferencial de leucocitos (%) y valores de bioquímica de suero en aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar de acuerdo a la edad de las aves para la aglutinación rápida en placa (ARP) en suero entero. Los valores representan el promedio \pm DE. 107
- Tabla 22.** Recuento total de glóbulos blancos, porcentaje diferencial de leucocitos (%) y valores de bioquímica de suero en aves agónicas provenientes de galpones con 108

antecedentes de tifosis aviar de acuerdo a la edad de las aves para la aglutinación rápida en placa (ARP) con suero diluido. Los valores representan el promedio \pm DE.

- Tabla 23.** Número y tipo de muestras utilizadas en el ensayo de presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano tomadas en galpones de granjas avícolas con antecedentes de brote de tifosis aviar. 109
- Tabla 24.** Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. presentes en muestras de agua, alimento y guano de galpones de aves de postura con antecedentes de TA. 110
- Tabla 25.** Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. presentes en muestras de clara (Cl) y yema (Y) de galpones de aves de postura con antecedentes de TA. 113
- Tabla 26.** Concordancia entre las muestras de clara y yema y entre los métodos empleados para la detección de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano para cada uno de los serovares de *Salmonella* y la cepa control *Bacillus subtilis*. 115
- Tabla 27. A.** Resultados generales de la encuesta realizada en las 20 granjas muestreadas con antecedentes de tifosis aviar y 20 granjas negativas a tifosis aviar muestreadas previamente. Se indica el número de galpones con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario. 117
- Tabla 27.B.** Resultados generales de la encuesta realizada en las 20 granjas muestreadas con antecedentes de tifosis aviar y 20 granjas negativas a tifosis aviar muestreadas previamente. Se indica el número de galpones con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario. 118
- Tabla 28.** Resultados del análisis univariado para la identificación de los factores de riesgo para la presencia de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum en los galpones con antecedentes de tifosis aviar. 119
- Tabla 29.** Resultado del análisis multivariado para la identificación de los factores de riesgo ($P < 0,05$) para la presencia de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum en galpones con antecedentes de tifosis aviar. 121
- Tabla 30.** Muestras ingresadas al laboratorio para el diagnóstico de tifosis aviar provenientes de diferentes provincias de la República Argentina durante el período de febrero de 2014 a noviembre 2016. 122
- Tabla 31.** Cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum seleccionadas para el estudio de sensibilidad a antibióticos. 123
- Tabla 32.** Cepas de *Salmonella* móviles incluidas en el estudio de sensibilidad a antibióticos. 124

Tabla 33. Perfiles de resistencia a antimicrobianos e índice de resistencia múltiple a antibióticos (RMAs) en aislamientos de SG provenientes de galpones de aves de postura con antecedentes de TA.	126
Tabla 34. Perfiles de resistencia a antibióticos y coeficiente de resistencia múltiple a antibióticos (RMAs) en aislamientos de <i>Salmonella</i> tipo móviles provenientes de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.	128
Tabla 35. Perfiles de resistencia a antimicrobianos (ATM) y coeficiente de resistencia múltiple a antibióticos (RMAs) en aislamientos de <i>Salmonella</i> móviles provenientes de pacientes humanos.	129
Tabla 36. Aislamientos de <i>S. ser. Gallinarum</i> biovar <i>Gallinarum</i> incluidas en la reacción de PFGE.	135
Tabla 37. Aislamientos de <i>Salmonella</i> sp. móviles incluidos en el ensayo de PFGE.	137

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencia mundial en la producción de huevos. Períodos 2000-2017 en miles de toneladas métricas (Conway, 2019).	2
Figura 2. Ranking mundial de productores de huevos (Conway, 2019).	3
Figura 3. Esquema técnico de la industrialización del huevo (Filadoro, 2015).	4
Figura 4. Distribución de granjas avícolas de producción de huevos por departamento de la provincia de Entre Ríos (Martínez y Borghello, 2019).	5
Figura 5. Distribución mundial de la producción de huevos por sistemas productivos en el año 2016 (Aguirre y Pizarro, 2018).	7
Figura 6. Representación esquemática de los órganos reproductivos de la gallina y su contribución durante la formación del huevo (De Buck, 2004).	24
Figura 7. Representación esquemática de la estructura del huevo (Food Standars Australia New Zeland, 2009).	24
Figura 8. Patogénesis de contaminación del huevo por <i>Salmonella</i> sp. (Gantois y col., 2009).	25
Figura 9. Aspecto de colonias de <i>Salmonella</i> Gallinarum biovar Gallinarum en diferentes medios agarizados selectivos-diferenciales (círculos blancos).	34
Figura 10. Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> sp.	36
Figura 11. Agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento en los animales en 30 países en 2017 (OIE, 2018).	45
Figura 12. Mecanismos de transmisión genética entre bacterias (Gyles y Boerlin, 2014).	48
Figura 13. Toma de muestra de sangre.	63
Figura 14. Inversión de fase en agar movilidad de Craigie.	68
Figura 15. Recuento de leucocitos en sangre entera.	72
Figura 16. Presencia de leucocitos fecales en hisopados cloacales.	74
Figura 17. Procedimiento para evaluar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano.	76
Figura 18. Procedimiento para evaluar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano mediante Kit explorer.	77
Figura 19. Procedimiento para evaluar la presencia de quinolonas mediante Kit Equinox.	78
Figura 20: Disposición de discos de antibióticos para la detección fenotípica en productores de BLEE.	83

Figura 21. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en muestras de agua y guano.	110
Figura 22 Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento en muestras hígado (A) y bazo (B) en placas sembradas con <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.	111
Figura 23. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento en muestras de clara y yema.	112
Figura 24. Presencia de sustancias inhibidoras en muestras de clara y yema de huevos provenientes de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar mediante kit comerciales.	114
Figura 25. Sensibilidad a diferentes antimicrobianos (ATM) en cepas de <i>S.</i> biovar Gallinarum.	125
Figura 26. Sensibilidad a diferentes antimicrobianos en cepas de <i>Salmonella</i> móvil aisladas de galpones de aves de postura con antecedentes de TA.	127
Figura 27. Sensibilidad a diferentes antimicrobianos en cepas de <i>Salmonella</i> móvil aisladas de pacientes humanos.	129
Figura 28. Amplicones obtenidos por PCR para el gen <i>gyrA</i> .	130
Figura 29 Amplicones obtenidos por PCR para el gen <i>qnrB</i> .	130
Figura 30. Dendrograma de la relación génica entre aislamientos de SG por ERIC-PCR.	133
Figura 31. Dendrograma de la relación génica entre aislamientos de SG y <i>Salmonella</i> móviles por PFGE.	139

ABREVIATURAS

APT	Agua de peptona tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (por sus siglas en inglés)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (por sus siglas en inglés)
CE	Comunidad Europea
CTS	Caldo tripteína de soja
CUB	Concepción del Uruguay Bacteriología
DER	Desvío estándar relativo
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (por sus siglas en inglés)
Esp	Especificidad
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (por sus siglas en inglés)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (por sus siglas en inglés)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
LIA	<i>Lysines Iron Agar</i> (por sus siglas en inglés)
MC	Agar Mac Conkey
MSRV	Medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado
OR	<i>Odds Ratio</i> (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EXA	Exactitud
Se	Sensibilidad
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SIM	Agar sulfuro-indol-movilidad
SS	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
TSI	<i>Triple sugar iron agar</i> (por sus siglas en inglés)
TT	Caldo tetraciónato
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (por sus siglas en inglés)
VB	Agar verde brillante
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
XLD	Agar xilosa lisina desoxicolato
XLT ₄	Agar xilosa-lisina-tergitol

Resumen/Summary

Resumen

El objetivo de este trabajo de tesis fue generar información referida a la contaminación por *Salmonella* sp. en granjas avícolas con brotes de tifosis aviar (TA), su relación con los parámetros bioquímicos, resistencia a antimicrobianos y los factores de riesgo asociados a la presencia de esta bacteria como herramientas para el diagnóstico y control de la salmonelosis. Se estudiaron 20 galpones de gallinas de postura con antecedentes de TA, tomando muestras ambientales (guano, hisopado de cama, nido, alimento, agua y huevos) y muestras de animales sacrificados y muertos (órganos, hisopados cloacales y sangre). El 2,7 %, 1,4 % y 1,4 % de las muestras de alimento, *pool* de cáscara y yema de huevo fueron positivos a *S. ser. Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG). Catorce muestras positivas a otras 6 serovariedades de *Salmonella* fueron obtenidas de guano, cama, nido y alimento. Por otro lado, el porcentaje de aislamiento de SG fue mayor en los órganos de las aves muertas que de las aves sacrificadas: 77,5 % vs. 32,1 % en médula ósea, 74,7 % vs. 36,7 % en bazo, 71,2 % vs. 34,0 % en hígado, y 63,8 % vs. 32,1 0% en folículos ováricos, respectivamente. El hisopado cloacal de aves sacrificadas fue la peor muestra para el aislamiento de SG, pero una muestra fue positiva para *Salmonella ser. Derby*. Las aves sacrificadas positivas a SG presentaron un mayor recuento total de glóbulos blancos y porcentaje de heterófilos y menor porcentaje de linfocitos. Los resultados de la encuesta sugirieron que los galpones que no realizaron vacunación para SG a sus aves (OR: 92,85) y no controlaban a las moscas (OR: 25,6) presentaron mayor riesgo de contaminación para esa bacteria. El 100 % de las cepas de SG fueron resistentes al ácido nalidíxico y a la presencia del gen *gyrA*. No se detectó el gen *qnrB* en las cepas de SG. El 18,1 % de los aislamientos de SG se clasificaron como multidroga resistentes. El presente trabajo de tesis aporta datos sobre el tipo de muestra útil para el diagnóstico de SG, los parámetros hematológicos y sensibilidad a antimicrobianos presentes en brotes de TA ocurridos en gallinas de postura.

Palabras claves: *Salmonella* sp., Tifosis Aviar, Parámetros hematológicos, Antimicrobianos, Factores de riesgo

SUMMARY

Serovars of *Salmonella* sp. in outbreaks of fowl typhoid occurred in commercial laying hens

The aim of this thesis work was to generate information about contamination by *Salmonella* sp. in poultry farms with outbreaks of fowl typhoid, their relation with biochemical parameters, antimicrobial resistant, and the risk factors associated with the presence of these bacteria as tools to salmonellosis diagnosis and control. Twenty-layer hen houses with fowl typhoid outbreaks were analyzed, taking samples from the environmental (feces, boot swabs from litter bed nest, feed, drinking water, eggs), and sacrificed and dead hens (organs, cloacal swabs, and blood). *S.* ser. Gallinarum biovar Gallinarum was found in feed (2.7 %), pool of shell (1.4 %) and yolk (1.4 %) samples. Six other serovars of *Salmonella* were isolate from 14 samples of feces, litter bed, nest and feed. On the other hand, the percentage of SG isolation was higher in the organs of dead birds than in sacrificed birds: 77.5 % vs. 32.1 % in bone marrow 74.7 % vs. 36.7 % in spleen, 71.2 % vs. 34.0 % in liver, and 63.8 % vs. 32.1 % in ovarian follicles, respectively. Cloacal swab was the worst sample for SG isolation, but one sample was positive to *Salmonella* ser. Derby. The SG positive laying hens showed a higher percentage of total white blood cells, percentages of heterophils, and a lower percentage of lymphocytes than negative ones. Results from the survey pointed out that farms without SG vaccination (OR: 92.85) and flies control (OR: 25.6) had a high risk of SG contamination. All SG isolates were resistant to nalidixic acid and positive to the *gyrA* gen. None of SG strains presented the *qnrB* gen. The 18 % of SG isolates were classified as multidrug resistant strains. The present work generates data about the type of samples to consider for the SG diagnosis, hematological parameters and antimicrobial profile in fowl typhoid outbreaks occurred in laying hens.

Key words: *Salmonella* sp., Fowl Typhoid, Hematological parameters, Antimicrobial, Risks factors

Introducción General

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, entre otros, delimitando claramente dos actividades distintas con características propias (Lamelas y col., 2011). Actualmente, los sistemas productivos han mostrado dinámicos cambios de acuerdo con las nuevas tendencias y exigencias, donde, cada vez más planteles adaptan tecnologías como jaulas automatizadas, galpones climatizados, o incluso sistemas productivos con aves libres de jaulas. Estos antecedentes revelan que es un sector en crecimiento, dinámico, y que presenta enormes desafíos en términos productivos, comerciales y medioambientales, entre otros (Aguirre y Pizarro, 2018)

La producción mundial de huevos ha aumentado entre los años 2000 y el 2016 en un 42 %, a una tasa promedio anual de 2,2 %. De acuerdo con los datos de la FAO (*Food and Agriculture Organization* por sus siglas en inglés, Figura 1), la producción del año 2017 alcanzó cerca de los 80,1 millones de toneladas métricas (Aguirre y Pizarro, 2018; Conway, 2019). Actualmente, China continúa siendo el principal productor de huevo (Figura 2), contribuyendo con casi cerca de 529 billones de huevos, seguido por Estados Unidos, India, México y Brasil (Conway, 2019).

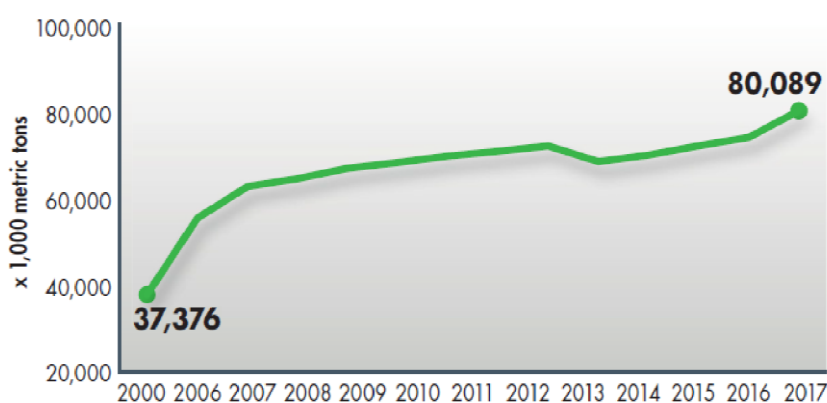


Figura 1. Tendencia mundial en la producción de huevos. Períodos 2000-2017 en miles de toneladas (Conway, 2019).

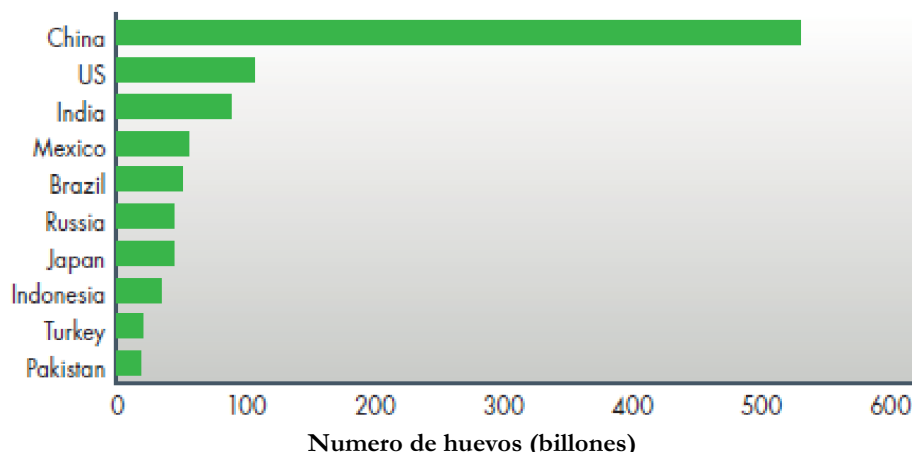


Figura 2. Ranking mundial de productores de huevos (Conway, 2019).

En los últimos años, el consumo del huevo en Latinoamérica ha tenido un crecimiento sostenido y, con algunas escasas excepciones, este crecimiento ha sido considerable. Tanto la producción como el consumo de huevo se han visto incrementados, por el crecimiento de la población, por su precio competitivo y también gracias a las campañas de fortalecimiento del consumo, que buscan promover una alimentación saludable y nutritiva (Díaz Arango, 2019).

De los países latinoamericanos productores de huevos, comparando los años 2016 y 2017, dentro del top 5 hubo una disminución de la población mexicana de ponedoras del 2 %; en Brasil, el incremento de las ponedoras en producción fue de 15,1 %, en Argentina del 2,5 %, en Colombia del 6,3 % y en Perú, del 15,7 %. No obstante, del total de 463.350 millones de aves, una de cada tres ponedoras en producción en Latinoamérica se encuentra en México, país que ostenta el 34,3 % de la población de gallinas y detrás le sigue Brasil con el 22,5 %, Argentina con el 9,5 %, Colombia con el 9,3 % y Perú con el 5,6 % (Ruiz, 2018).

En 2018, cada latinoamericano consumió en promedio 209 huevos al año. En comparación con 2017 —194 unidades per cápita—, el consumo de huevo aumentó 7,7 %. En el caso de México, el consumo fue de 367 huevos al año por persona. Varios países tuvieron consumos por encima de 210 huevos por persona al año, como Colombia (294 unidades), Uruguay (282 unidades) Argentina (271 unidades), Ecuador (227) Chile (223 unidades), Costa Rica (220 unidades), Perú (217 unidades). Por otro lado, nueve países tuvieron un consumo menor al promedio, principalmente centroamericanos, de los cuales Nicaragua ocupó el último lugar con 115 huevos per cápita (Ruiz, 2018; Anónimo, 2019; Ruiz, 2019). Prida (2015) realizó una proyección para el año 2030 donde se espera que el consumo de huevo per cápita sea de 299 huevos por persona al año en Argentina.

A nivel Nacional, durante el año 2018 las exportaciones de huevo industrializado aumentaron un 3 % en volumen y 20 % en valor respecto al año 2017, alcanzando 3.348 toneladas y 18.961 miles de USD FOB. Los envíos fueron los siguientes: 1.866 tn de huevo entero en polvo, 691 tn de albúmina y 388 de yema en polvo. Se observó un aumento de 19 % en los envíos de huevo entero en polvo y una disminución de 42 % de yema y, en menor medida, de albúmina 10 % (Mair y Beczkowski, 2018).

En tanto, la exportación de huevo en cáscara aumentó un 201 % en volumen y 460 % en valor. Sólo se registraron envíos en enero y febrero del año 2018. La composición de los envíos fue la siguiente: 63 % huevo de uso industrial, 23 % albúmina y 13 % yema. Se registraron 403 toneladas de huevo en cáscara. El 56 % de los destinos de exportación de huevo industrializado fueron confidenciales (fuente Indec), el 13 % Israel, 7.6 % Japón, 5.4 % Rusia, 5 % Chile, 2 % Austria y el 11 % restante corresponde a Uruguay, Sudáfrica, Macedonia, Cuba, Dinamarca y otros (Mair y Beczkowski, 2018).

La industria del huevo de Argentina incluye la cría y reproducción de padres de genética importada y la cría y reproducción de aves ponedoras, las cuales son enviadas a las granjas productoras de huevo para que, una vez alcanzada la madurez sexual, comiencen la puesta. Aproximadamente, el 90% de la producción de huevos se comercializa en fresco, para lo cual requiere de un proceso de acondicionamiento, clasificación y envasado. El resto se destina a industrialización, proceso a partir del cual se obtienen los ovoproductos (huevo líquido o en polvo), utilizados mayormente por la industria alimenticia (Figura 3, Filadoro, 2015).

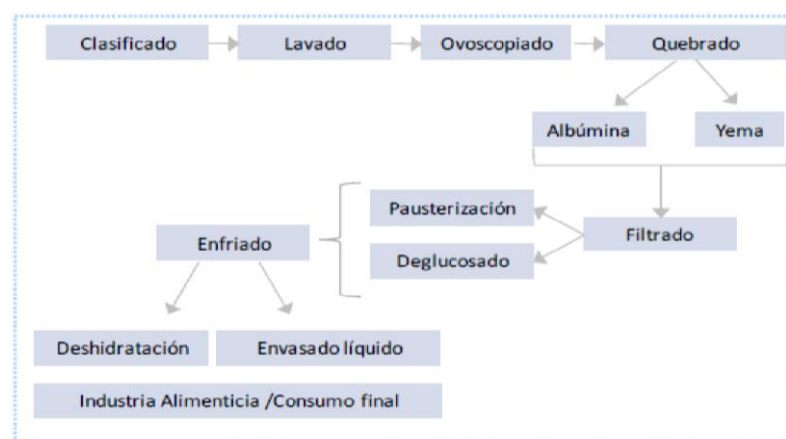


Figura 3. Esquema técnico de la industrialización del huevo (Filadoro, 2015).

A nivel Nacional, el 18 % de las granjas avícolas se dedica a la producción de huevos (SENASA, 2019). En la provincia de Entre Ríos, existe un total de 2.645 granjas avícolas que incluyen a todos los tipos de producción, donde el 7,5 % corresponden a la

producción de huevos. Por otro lado, más del 60 % de las granjas de producción de huevos (Figura 4) están concentradas en la costa del río Paraná (Martínez y Borghello, 2019).

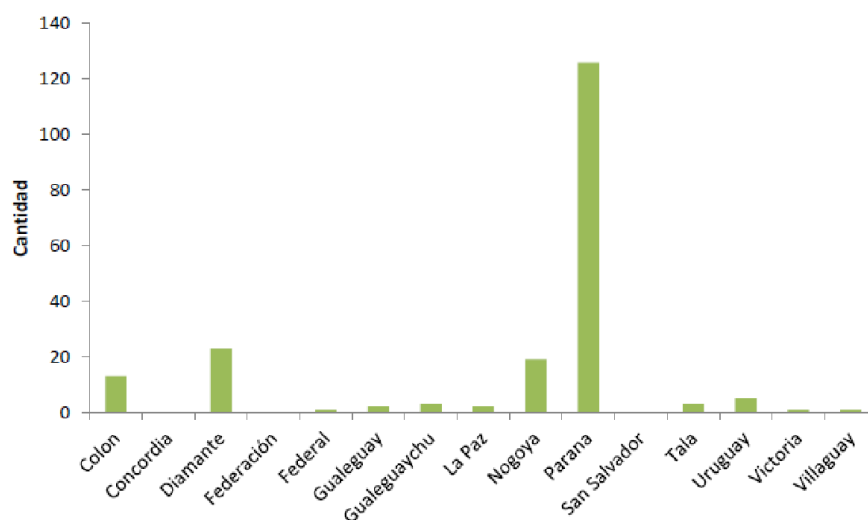


Figura 4. Distribución de granjas avícolas de producción de huevos por departamento de la provincia de Entre Ríos (Martínez y Borghello, 2019).

La cadena del huevo se encuentra más automatizada que la de la carne, existen granjas independientes que cuentan con instalaciones propias y se proveen de las aves ponedoras y el alimento. Destinan parte de la producción al mercado minorista y el resto lo destinan al consumo mayorista o a la industria de ovoproducidos. La etapa industrial de esta cadena se encuentra altamente concentrada; en general a medida que las empresas industrializadoras aumentan la escala de producción, hay un mayor nivel de tecnificación (Filadoro, 2015).

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).

2. Aves de postura y sistemas de producción.

Las gallinas ponedoras son el resultado de una selección genética y su explotación más importante 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).

La etapa de postura de las gallinas ponedoras en condiciones favorables de alojamiento, alimentación, agua, sanidad, luz y manejo adecuado, asociadas directamente a la raza y a la buena cría y desarrollo de las pollas en las etapas anteriores, da como resultado una excelente postura en cuanto a la cantidad de huevos, tamaño, calidad y eficiencia frente al consumo de alimento (Anónimo, 2013). El ave de postura comienza su producción entre las 20 y las 24 semanas de vida al alcanzar la madurez sexual hasta las 70 u 80 semanas. Posteriormente, suelen encontrarse muy delgadas y son faenadas como aves de desecho (Anónimo, 2013; Albarrán y col., 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). A las gallinas en la etapa de postura se les debe suministrar el alimento en una mezcla balanceada a libre consumo, la cual se compone especialmente por un 17 % de proteína, vitaminas y minerales, fundamentalmente de calcio en razón de la alta demanda de este elemento en la formación de la cáscara del huevo (Anónimo, 2013; Albarrán y col., 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 y col., 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. En la figura 5 se puede observar la participación de los distintos sistemas productivos en la producción de huevos a nivel mundial. Actualmente, casi el 90% se produce en jaulas (sistemas tradicionales) y sólo el 2,5% de los huevos se producen bajo el régimen *free-range* (“salida a pradera”), pero se espera mayor dinamismo en este sentido (Aguirre y Pizarro, 2018).

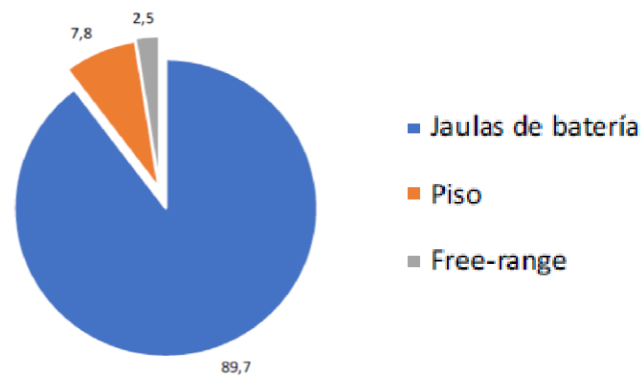


Figura 5. Distribución mundial de la producción de huevos por sistemas productivos en el año 2016 (Aguirre y Pizarro, 2018).

En los 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 y col., 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).

El objetivo en la producción avícola con sistemas alternativos o *free-range* (“salida a pradera”) 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 y col., 2011). Un mayor espacio permite a las aves realizar un repertorio más amplio de comportamientos (Lay y col., 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 y col., 2011). En cuanto al tipo de alojamiento de las gallinas y la tecnología adoptada, en Argentina conviven distintos sistemas de producción, entre los clásicos, antiguos, abiertos, y los galpones automáticos. Incluso la mayoría de las granjas que tienen automatización, también tienen parte de los galpones antiguos. No existe prácticamente la producción de huevo a piso, como así tampoco la producción en galpones con equipamiento de jaulas enriquecidas, ni sistemas sin jaulas (Rodríguez y col., 2016). El 85 % de las aves está en jaulas, el 10 % en sistemas de piso y el 5 % al aire libre (Evans, 2015). Las razas de gallinas más utilizadas en el país son las Hy-Line, Lohmann, y H&N (Anónimo, 2020).

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 y col., 2011).

3. Riesgos sanitarios en granjas.

Distintos factores de riesgo pueden estar implicados en la contaminación microbiológica de las gallinas ponedoras y el huevo (Gama y col., 2003; Howard y col., 2012). Entre los más importante, estos factores son el movimiento de las personas encargadas de las granjas, la exposición a roedores, los insectos, los animales domésticos, aves silvestres, el agua y el alimento.

Las aves pueden infectarse con bacterias del género *Salmonella* debido al consumo de alimento balanceado contaminado, cuyos ingredientes pueden ser de origen animal (expeller y harina de carne, hueso, pescado, entre los más importantes) o vegetal (maíz, expeller, harina y poroto de soja), siendo los ingredientes de origen animal la principal fuente de contaminación (Quiroz, 1987).

La contaminación bacteriana de los huevos frescos puede darse por dos vías: transovárica (transmisión vertical) o a través de la cáscara (transmisión horizontal). La transmisión vertical se considera la principal vía de contaminación por *Salmonella* sp. y resulta la más difícil de combatir, mientras que la transmisión horizontal puede disminuirse eficazmente mediante medidas de limpieza y desinfección del entorno (Gast, 2003).

Además de la contaminación microbiana, existe la contaminación química de los huevos, y entre estos contaminantes, que pueden estar presentes en el huevo, se encuentran las dioxinas, los pesticidas, metales pesados y antimicrobianos (Holt y col., 2011; Samandoulougou y col., 2016). Cuando se encuentran cepas del género *Salmonella* en las granjas, el uso de antimicrobianos ayuda a disminuir las pérdidas causadas por la mortalidad en las aves afectadas. Sin embargo, el uso periódico de antibióticos induce no solamente a resistencia por parte de este microorganismo, sino también a la formación de aves portadoras crónicas que eliminan *Salmonella* sp. al medio ambiente y son quizá el principal foco de diseminación dentro de un lote (Botero Hoyos, 2007).

4. Género *Salmonella*.

Daniel E. Salmon (1850-1914) informó el primer aislamiento de *Salmonella* en cerdos en 1885 y llamó al organismo como *Bacterium choleraesuis*, hoy conocido como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Choleraesuis (Bhunja, 2008). Este aislamiento fue realizado junto a su colaborador Theobald Smith (1859-1934), quien trabajó en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (del inglés, United States Department of Agriculture, USDA). Sin embargo, existe evidencia epidemiológica previa a la identificación de este agente asociado al consumo de agua y leche productores de fiebre tifoidea (Mølbac y col., 2006).

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 a excepción de *Salmonella Gallinarum* biovar Gallinarum (SG) y biovar Pullorum (SP). 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 y col., 2006). Sin embargo, en la literatura se describe que un 1 % de las cepas de *Salmonella* fermentan a la lactosa (Edwards y Ewing, 1986) y algunas también a la sacarosa (Gonzalez, 1966). Además de las pruebas culturales y bioquímicas generales comunes a todas las cepas de *Salmonella* deben realizarse pruebas específicas que permiten distinguir ambas biovariedades inmóviles (SG y SP). Es posible establecer su diferenciación rápida en los laboratorios de diagnóstico mediante las pruebas que se detallan en la Tabla 1 (Chacana y Terzolo, 2003).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación entre *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum y biovar Pullorum (Chacana y Terzolo, 2003).

Prueba	<i>S. ser. Gallinarum</i>	
	Biovar Gallinarum	Biovar Pullorum
Glucosa	Fermenta sin gas	Fermenta con gas
Manitol	Fermenta sin gas	Fermenta con gas
Maltosa	Fermenta sin gas	Usualmente no fermenta
Dulcitol	Fermenta sin gas	No fermenta
Ornitina	No fermenta	Fermenta
Tartrato de Jordan	Fermenta	No fermenta

4.1. Nomenclatura y taxonomía.

En lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía, el género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones a través de los años. Sin embargo, todavía se siguen usando muchos de los métodos descritos 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).

Actualmente, existen otros sistemas de tipificación de *Salmonella* basados en la susceptibilidad a bacteriófagos (fagotipificación) y en base a la resistencia a antibióticos (Bhunia, 2008). La tipificación por técnicas de hibridación del ADN de la bacteria permitió incorporar 63 nuevas serovariedades las cuales corresponden a *Salmonella enterica* (Issenhuth-Jeanjean y col., 2014).

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 y col., 2000). Actualmente, se reconocen 2.659 serovares (Tabla 2, Issenhuth-Jeanjean y col., 2014).

Tabla 2. Número de especies, subespecies y serovariedades del género *Salmonella* (Issenhuth-Jeanjean y col., 2014).

Género	Especies	Subespecies de <i>Salmonella</i>	N° de serovariedades
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1.586
		<i>salamae</i> (II)	522
		<i>arizonae</i> (IIIa)	102
		<i>diarizonae</i> (IIIb)	338
		<i>boutenae</i> (IV)	76
		<i>indica</i> (VI)	13
	<i>bongori</i> (V)	-	22
TOTAL			2.659

4.2. Hábitat.

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 epidemiológico las cepas del género *Salmonella* pueden clasificarse en 3 grupos (Caffer y col., 2014):

- ✓ Las que afectan tanto al hombre como a los animales (la mayoría de las serovariedades responsables de la salmonelosis).
- ✓ Las que afectan sólo al hombre (*Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Paratyphi A y *Salmonella* ser. Paratyphi C).
- ✓ Las que están adaptadas a especies animales específicas: *Salmonella* ser. Abortusovis, *Salmonella* ser. Abortusequi, SG y SP.

4.3. Estructura antigénica.

La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar, ya que se pone en evidencia la presencia de los diferentes antígenos (Caffer y col., 2014).

✓ Antígeno somático O (Ag O, de pared celular): es un lipopolisacárido (LPS), termoestable, tipo-específico, presente en todos los microorganismos Gram negativos y formado por cadenas laterales de polisacáridos del LPS de envoltura. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Esta estructura difiere entre las distintas serovariedades. A su vez, los Ags O se clasifican en factores mayores (que identifican el grupo antigénico O) y factores menores. Estos últimos pueden ser de dos tipos: a) los que tienen poco o ningún valor discriminativo porque siempre están asociados a otro factor (ej. O12, siempre está asociado a los factores O2, O4 y O9) y b) los que surgen como consecuencia de una modificación química de los Ags O mayores (Tunes y Vigo, 2007; Caffer y col., 2014)

✓ Antígeno flagelar H (Ag H): es de naturaleza proteica. El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (*hook*) y un filamento. Este último está constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular y es el que se usa en la serotipificación por su alta especificidad. En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de la flagelina. Estos antígenos son sensibles al calor (Tunes y Vigo, 2007; Caffer y col., 2014).

✓ Antígeno capsular Vi (Ag Vi): El antígeno capsular es un polisacárido, constituido por ácido N-acetilglucosaminourónico. Entre los antígenos capsulares de las

enterobacterias, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*. Se encuentra sólo en tres serovariedades: *S. ser. Typhi*, *S. ser. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. ser. Dublin*. Es termolábil y le confiere a la bacteria resistencia a la fagocitosis (Tunes y Vigo, 2007; Caffer y col., 2014).

4.4. Patogenicidad.

La infección por *Salmonella* sp. depende de la capacidad de la bacteria de colonizar (adherirse) e ingresar (invadir) a las células intestinales, de replicar en el interior de las mismas dentro de vacuolas y de resistir la digestión de los fagocitos, lo que facilita su difusión en el organismo. Las *Salmonella* tíficas (móviles) pueden atravesar la pared intestinal siguiendo 3 rutas: a- a través del tejido linfoideo de las placas de Peyer, situadas en la entrada de los ciegos, b- por el tejido linfático difuso del intestino y c- mediante una célula dendrítica que desde la lámina propia emite un pseudópodo a través del espacio intercelular de los enterocitos y directamente captura el microorganismo en el lumen intestinal. (Montville y Mathews, 2008; Terzolo y Chacana, 2016). Las salmonelas libres en la lámina propia son fagocitadas por macrófagos y resisten su acción destructiva causando la apoptosis del macrófago que la contiene, generando una inflamación local que atrae más macrófagos, que su vez fagocitan más salmonelas y se generan “vacuolas contenedoras de salmonelas”, en donde las bacterias se multiplican, llegando a los capilares sanguíneos y de esa manera son transportadas por el torrente circulatorio difundiéndose por todo el organismo, colonizando especialmente los órganos del sistema retículo endotelial y del aparato reproductor (Terzolo y Chacana, 2016). Por el contrario, SG al ser inmóvil, puede evadir la respuesta inmune del ave. Los macrófagos infectados con SG alcanzan el hígado y se desencadena la apoptosis de la célula infectada. Luego, las bacterias son liberadas, y posteriormente, se multiplican fuera de la célula colonizando la vesícula biliar y al mismo tiempo invaden a los hepatocitos y se multiplican intracelularmente en esas células (Terzolo y Chacana, 2016).

Los genes de virulencia se encuentran localizados en 12 islas de patogenicidad (SPI, por sus siglas en inglés *Salmonella pathogenicity islands*), algunas de ellas localizadas cerca de los genes que codifican el ácido ribonucleico de transferencia (ARNt). Se cree que algunas SPIs son adquiridas por transferencia horizontal, mientras que otros genes son altamente conservados. Los genes de virulencia implicados en la fase intestinal de la infección están localizados en las SPI 1 y SPI 2; los restantes son necesarios para producir la infección

sistémica, supervivencia intracelular, expresión de las fimbrias, resistencia a antibióticos y absorción de iones magnesio y hierro (Bhunia, 2008).

La SPI 1 es un segmento que fue adquirido por transferencia horizontal de genes durante la evolución y contiene 31 genes (responsables de la invasión de células no fagocíticas) y el componente de secreción tipo III (TTSS, por sus siglas en inglés *type three secretion system*) designado como el aparato de secreción Inv/Spa-Type III. Algunos de los genes implicados son: *invA*, *invB*, *invF*, *invG*, *hilA*, *sipA*, *sipC*, *sipD*, *spaR*, *orgA*, *sopB* y *sopE* (Bhunia, 2008). Los genes presentes en las SPIs son blancos moleculares utilizados para la detección de *Salmonella* en muestras clínicas y alimentos mediante técnicas de biología molecular (Montville y Mathews, 2008).

5. *Salmonella* y Salud Pública.

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial, de origen alimentario debido a que los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión (Caffer y Terragno, 2001). El principal reservorio de *Salmonella* se encuentra en los animales y los microorganismos son transmitidos al hombre, ya sea por contacto directo o a través de productos alimenticios contaminados de origen animal, tales como: huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carne roja y sus derivados; carne de aves de corral; leche cruda y productos lácteos (Caffer y Pichel, 2006).

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, adultos mayores de 60 años y aquellos individuos inmunocomprometidos o aquellos que padecen enfermedades crónicas son los más vulnerables a la salmonelosis (Bell y Kyriakides, 2002).

Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo, el 60–80 % de los casos son esporádicos. A veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternales, geriátricos, restaurantes, etc.

(Caffer y Terragno, 2008). Si bien *Salmonella* se detecta en productos avícolas, también se describieron brotes de salmonelosis causados por el consumo de productos de la pesca, leche, ensaladas, etc. El agua es uno de los vehículos de transmisión de este patógeno como así también las personas que trabajan en el procesado y servicio de alimentos (Yousef y Carlstrom, 2006).

Por ello, el rol de los alimentos en su diseminación debe ser considerado por la industria alimenticia en relación con el control de este microorganismo (Bell y Kyriakides, 2002). El incremento registrado a escala mundial en las últimas décadas se debe a los cambios integrales asociados a factores que extienden su ocurrencia como el aumento de la población, que determina cambios en las características demográficas y costumbres culturales, migraciones internas y comercio inapropiado de alimentos.

Distintos factores han contribuido también a aumentar la frecuencia de la salmonelosis: la adaptación de los microorganismos a nuevas condiciones ambientales con la emergencia de microorganismos o reemergencia de otros, aparición de grupos vulnerables o más expuestos, aceleración de la urbanización, deficiencia en la vigilancia epidemiológica, nuevos métodos de producción de alimentos en gran escala, cambios en las dietas de los consumidores (comidas fuera del hogar, incremento en el uso de las comidas comerciales) y mayor facilidad de realizar viajes internacionales. De este modo es necesario implementar medidas de control adecuadas, conformando equipos multidisciplinarios e intersectoriales, con el fin de reglamentar acciones conjuntas de educación, control, supervisión, investigación y realización de una vigilancia integrada (Abriata y col., 2016).

Desde 1985 a 1999, en el 80 % de los casos de infecciones esporádicas producidas por *S. ser. Enteritidis* (SE) informados por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (del inglés, CDC), los huevos o alimentos que contenían huevos fueron confirmados como el vehículo de infección (Patrick y col., 2004). Por su parte, en la Unión Europea (UE), se identificó a SE en el 62,5 % y *S. ser Typhimurium* (ST) en el 12,9 % de los casos de infección en humanos. En menos del 2 % de los casos, se identificaron otras serovariedades, como ser *S. ser. Infantis*, *S. ser. Virchow*, *S. ser. Newport*, *S. ser. Hadar*, *S. ser. Stanley*, *S. ser. Derby*, *S. ser. Agona* y *S. ser. Kentucky* (Gantois y col., 2009).

Actualmente, en la UE, la salmonelosis es la segunda infección gastrointestinal reportadas en humanos. En 2018, *Salmonella* causó el 30,7% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) causando 11.581 casos en humanos, que comparado con

el año anterior incrementó un 20,6 %. Los brotes de SE aumentaron un 36,3 % en comparación con 2017, pero esto se debió principalmente a un solo miembro de la UE (Eslovaquia). Los brotes de *Salmonella* sp. y SE fueron causados durante 2018 principalmente por huevos y productos de huevo, seguidos por productos de panadería y alimentos mixtos, como en años anteriores (EFSA, 2019).

Por otra parte, el CDC reportó que la incidencia de infecciones con los serotipos de ST y *S. ser. Heidelberg* en 2017 disminuyó, y la incidencia de los serotipos *S. ser. Javiana*, *S. ser. Infantis* y *S. ser. Thompson* aumentó, en comparación con el período 2006–2008. Entre 6.373 (89 %) aislamientos de *Salmonella* completamente serotipificados, los cinco más comunes fueron SE (incidencia = 2,6 por 100.000 habitantes), ST (1,4), *S. ser. Newport* (1,3), *S. ser. Javiana* (1,1) y la variante monofásica de ST (I 4, [5], 12: i: - ; 0,9). Entre los 13 serotipos más comunes, la incidencia de *S. ser. Heidelberg* en 2017 fue 65 % menor que durante 2006–2008 y 38 % menor que durante 2014–2016. También fue significativamente menor para ST en ambos períodos (42 % y 14 %, respectivamente). Los nuevos requisitos reglamentarios que incluyen pruebas mejoradas de productos avícolas para detectar *Salmonella* podrían haber contribuido a esta disminución (Marder y col., 2018).

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

por el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella*, las serovariedades prevalentes en humanos en nuestro país, fueron ST seguida por SE (Caffer, comunicación personal).

6. Salmonelosis en gallinas ponedoras.

Las bacterias del género *Salmonella* pueden causar infecciones sin producir signos clínicos (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 y col., 2009).

Diversos factores pueden afectar la susceptibilidad de las aves de corral a la colonización por *Salmonella* (Bailey, 1988). Estos factores incluyen: edad de las aves, serotipo de *Salmonella* implicado y el nivel de la dosis infectiva inicial, estrés, resistencia del patógeno a la acidez del estómago, competencia con la microflora del intestino, condiciones genéticas del hospedador, vectores animados como insectos, humanos, roedores u otros animales, vectores inanimados tales como vestimenta e implementos avícolas contaminados, etc.

Las infecciones producidas por *Salmonella* sp. en avicultura se pueden dividir en dos grandes categorías. En la primera, se encuentra SG y SP, las cuales ocasionan infecciones sistémicas agudas. La morbilidad y mortalidad debidas a la infección por estas biovariedades dependen de distintas variables: edad y estado nutricional de las aves, manejo de los lotes e infecciones concurrentes. Las mayores tasas de mortalidad, en algunos casos, pueden llegar al 100%. Puede registrarse una alta mortalidad en gallinas ponedoras no inmunes, pues son muy susceptibles, debido al estrés que implica la intensa producción de huevos. Las pérdidas económicas causadas por estas biovariedades pueden ser muy altas, no sólo por la pérdida de animales debido a la mortalidad, sino también por los costos veterinarios involucrados, eliminación de las aves muertas, saneamiento de las instalaciones infectadas, etc. (Chacana y Terzolo, 2003).

En la segunda categoría se incluyen *Salmonella* sp. móviles, las cuales son la principal causa de enfermedad en humanos. A este grupo pertenecen la gran mayoría de las serovariedades de *Salmonella* (Gast, 2003). En cuanto a las serovariedades encontradas de este tipo en las aves de corral predominan ST, SE y *S.* ser. Heidelberg (Foley y col., 2008). Antes de la década de 1960, SE fue rara entre las aves de corral; sin embargo, con la disminución de SG y SP, la prevalencia de SE aumentó (Foley y col., 2008).

6.1. Paratifosis aviar.

Las numerosas serovariedades móviles de *Salmonella* sp. se conocen en avicultura, usualmente, con el nombre de Salmonelas paratíficas. Existe una importante relación epidemiológica entre los productos avícolas y las infecciones en humanos, debido a que muchas de las serovariedades encontradas en humanos (como ST y SE) son comunes a las halladas en la producción avícola (Gast, 2007, 2008).

Los registros mundiales de la frecuencia de aislamientos de serovariedades de *Salmonella* de origen avícola generan un amplio rango de resultados. SE ha sido la serovariedad más frecuentemente aislada de huevo en Italia (Busani y col., 2005), carcasas de pollo en Polonia, España y Korea (Capita y col., 2003; Chung y col., 2003; Mikołajczyk y Radkowski, 2002). *S. ser. Heidelberg* se encontró en pollos parrilleros y pavos de Canadá (Guerin y col., 2005) y en gallinas ponedoras de los Estados Unidos (Kinde y col., 2005); ST fue aislada de pollitos parrilleros en Estados Unidos (Liljebjelke y col., 2005). *S. ser. Livingstone* (SL) y *S. ser. Infantis* se hallaron en ambientes de producciones avícolas en Japón (Murase y col., 2001; Murakami y col., 2001); mientras que *S. ser. Kentucky* y *S. ser. Agona* se encontraron en carne de pollo en los Estados Unidos (Logue y col., 2003; Zhao y col., 2006).

En Argentina, en la década de los años 80, se aislaron ST, SE y *S. ser. Livingstone* de granjas, mientras que *S. ser. Anatum* y otras serovariedades fueron aisladas de harinas utilizadas para la fabricación de alimentos balanceados y de aves faenadas (Terzolo, 1980; Mercado, 1983; De Franceschi y col., 1988). Durante el período 1986-1993 se reportaron 68 cepas de SE de criaderos de pollos parrilleros, reproductores pesados y gallinas ponedoras, el 38 % correspondientes al fagotipo PT4, el 8 % al PT7 y el 16 % restante a los PT1, PT5-a, PT9-a y PT12. Todas estas cepas presentaron transmisión vertical y horizontal y alta patogenicidad (Velilla y col., 2004).

Sandoval y col. (1989) describieron casos de paratifosis causados por SE 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 esta serovariedad, en segundo lugar, se debe considerar las cepas patógenas de ST, 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. Estudios recientes de Soria y col (2017) aislaron *Salmonella* sp. en 14 granjas de aves de postura de la provincia de Entre Ríos, y fueron tipificados en 17 serotipos, siendo los más frecuentes *S. ser.*

Schwarzengrund (17.5%), SE (15%), *S. ser.* Mbandaka (7,5%) y *S. ser.* Newport (7,5%). Por otro lado, 12 granjas presentaron contaminación por múltiples serotipos. Por su parte, el Plan Nacional de Sanidad avícola de Argentina (SENASA, 2018) tiene incorporados para su control en granjas de pollos parrilleros y granjas de gallinas de postura comercial a SE, ST y *S. ser.* 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 paratifosis en aves adultas. En general, no se informan signos o enfermedad clínica en infecciones experimentales, con grandes dosis orales de *Salmonella* sp. paratíficas (Humphrey y col., 1989). Las dos características observadas con mayor frecuencia en las aves adultas son: la colonización intestinal y la diseminación hacia los órganos internos. Okamura y col. (2001) inocularon gallinas adultas con seis serovariedades por separado (SE, ST, *S. ser.* Heidelberg, *S. ser.* Hadar, *S. ser.* Infantis y *S. ser.* Montevideo), donde la única serovariedad asociada con signos clínicos de depresión y disminución en la alimentación fue SE, la cual causó una bacteriemia más prolongada.

En la actualidad, se encuentran disponibles vacunas vivas atenuadas de SE en varios países de Latinoamérica. Estas cepas atenuadas invaden y colonizan el tracto gastrointestinal, compitiendo con cepas salvajes por receptores de adherencia 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. Asimismo, la cepa vacunal de SE 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 un día de edad (Alvarado, 2009).

En Argentina, el Plan Nacional de Sanidad Aviar (SENASA, 2018), dentro de las medidas implementadas para el control de *Salmonella* indica el uso de vacunas vivas y/o inactivadas contra SG y/o SE u otra serovariedad oportunamente aprobadas por el SENASA, a fin de alcanzar una disminución efectiva en la diseminación de salmonelas y/o inhibición de su crecimiento en huevos.

6.2. Tifosis aviar.

El término tifosis aviar (TA) designa las infecciones causadas por SG (OIE, 2008), la cual es una enfermedad septicémica específica de aves (aves de corral y otras especies de producción, incluyendo aves de caza, patos y faisanes). Aunque son susceptibles las aves de todas las edades, la tifosis aviar, usualmente afecta a las aves adultas (Barrow y Freitas Neto, 2011).

La TA tiene muy baja posibilidad de curación. Este hecho determina la interrupción del ciclo productivo del establecimiento y, por consiguiente, una elevada pérdida económica. La morbilidad es alta entre todas las edades de las aves, mientras que la mortalidad puede variar entre un 10 % al 90 % (Beyaz y col., 2010). 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 un 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).

En Argentina, a fines de 1973, comienza una inusitada diseminación de SG, afectando a aves de todo tipo. Hoy en día, 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; y el uso de vacunas ineficaces (SENASA, 2003).

En la actualidad la TA tiene escasa presencia en las granjas de aves de corral reproductoras en Argentina. Sin embargo, no ha ocurrido lo mismo con ponedoras comerciales. En los años 2007, 2008 y 2009, se reportaron 12, 41, y 31 brotes, respectivamente en el país (Terra, 2012). La posible causa de que SG continúe en gallinas ponedoras puede deberse al uso de vacunas ineficaces y no siempre controladas o al mal uso de las mismas, así como a cierto abandono de medidas higiénicas de profilaxis (SENASA, 2003).

De acuerdo a datos de la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE), los Estados Unidos reportaron su último caso de tifosis aviar en 1981 (Barrow y Freitas Neto,

2011). En cuanto a Europa, se han detectado brotes en distintos países. En el Reino Unido, SG fue aislada de una granja comercial y de un pequeño criadero en el año 2005. En España no se han reportado casos de tifosis desde 1991. En Alemania, SG se diagnosticó entre 2005 y 2008 (Barrow y Freitas Neto, 2011). Korea ha cobrado importancia en relación a la tifosis aviar, debido al informe de 1.000 brotes entre los años 2000 y 2008 (Kwon y col., 2010).

Los países que han aplicado estrictos planes de control han logrado erradicar esta enfermedad de las explotaciones industriales, aunque en algunos casos se detecta esta bacteria en poblaciones de aves silvestres o domésticas criadas en pequeños establecimientos de campo (Chacana y Terzolo, 2003). Se ha sugerido que la desaparición de SG y SP 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 SE. Se postuló que este último serotipo ocupó el nicho ecológico vacante de SG y SP (Barrow y Freitas Neto, 2011). Sin embargo, este hecho no es concluyente, ya que en varios países latinoamericanos coexisten tanto la tifosis como la paratífosis aviar (Terzolo, 2008).

La infección por SG puede ocurrir tanto por vía horizontal, como vertical. La transmisión horizontal es más significativa para esta biovariedad (Barrow y Freitas Neto, 2011). La transferencia horizontal puede ocurrir por la ingesta de heces infectadas o por canibalismo. En cuanto a la tasa de transmisión vertical, la presencia de SG en los huevos provenientes de gallinas infectadas es relativamente baja. Se ha encontrado que sólo un 3 % de los huevos puestos por gallinas infectadas transportaban la bacteria (Chacana y Terzolo, 2003). Por otro lado, la transmisión vertical puede estar asociada con infecciones persistentes en ausencia de casos clínicos (Berchieri Júnior y col., 2000).

Un brote agudo de SG en aves maduras puede comenzar con una caída repentina en el consumo de alimento, varias aves parecen caídas y rizadas con cabezas pálidas, y se encuentran alrededor de la fuente de agua bebiendo con frecuencia y comiendo poco, especialmente durante la etapa febril. La temperatura de las aves aumenta de 2 ° a 5 °C dentro de 2 o 3 días después de la exposición a SG y puede permanecer hasta unas pocas horas antes de la muerte. Después de las primeras muertes, la enfermedad se propaga rápidamente a través del galpón, causando un número creciente de muertes todos los días durante varios días, después de lo cual el número de muertes disminuye, generalmente en 2 a 3 semanas (Hall y col., 1949).

En cuanto a la signología, las aves pueden manifestar depresión, somnolencia, anorexia, alas caídas, deshidratación, respiración dificultosa, diarrea, debilidad y adherencia de las heces a la cloaca (Chacana y Terzolo, 2003). Las aves adultas que manifiestan la enfermedad pueden desarrollar ovarios deformados y reducidos con folículos adheridos por tallos fibrosos pedunculados. 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).

Aunque contra SG 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 TA y sólo para gallinas ponedoras en Argentina. La misma es un tipo de vacuna muy efectiva, aunque con cierto poder patogénico residual (Huberman, 2010). Una ventaja de la vacuna 9R es que adicionalmente protege contra SE (Barrow y col., 1991; Feberwee y col., 2001).

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

6.3. 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 y col., 2009). La capacidad de los diferentes serotipos de *Salmonella* para sobrevivir y prosperar en diferentes entornos del huésped implica una serie de actores interconectados, incluidas las diferencias en los entornos del huésped (pH, temperatura y sitios de unión, etc.), el sistema inmunitario del huésped y su respuesta a diferentes serotipos, los organismos comensales presentes y la genética del patógeno en sí (Foley y col., 2013). La salmonelosis de las aves tiene tres fases distintas durante las cuales hay una interacción significativa con el sistema inmune (Chappel y col., 2009):

✓ **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 SG y SP no produce una inflamación entérica substancial, a diferencia de lo que ocurre con ST o SE.

✓ **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 la supervivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos y produce una atenuación de las infecciones sistémicas cuando las aves se infectan con cepas de SG, SP o ST carentes de SPI-2.

✓ **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, *Salmonella* se multiplica en el bazo y en el hígado causando lesiones en estos órganos (hepato y esplenomegalia). Si la infección progresa puede causar la muerte del animal.

Particularmente, SG a diferencia de otros patógenos intracelulares que se multiplican libremente en el citoplasma, induce la formación de vacuolas intracelulares, donde se multiplica, y queda protegida de la acción de anticuerpos, lisozimas y de antibióticos que no pueden realizar ninguna acción intracelular. Los macrófagos transportan a SG dentro de la "vacuola que contiene *Salmonella*" y la diseminan sistémicamente. Los macrófagos infectados ingresan por diapédesis en los vasos sanguíneos y son arrastrados por el torrente sanguíneo al retículo, los tejidos endoteliales y reproductivos (Chappel y col., 2009).

La mayor parte de la evidencia de los mecanismos de limpieza inmunitaria en la infección por *Salmonella* surge de datos experimentales de infección por ST o SE. Inicialmente, la etapa sistémica de ST 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

(Chappell y col., 2009). Setta y col. (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 SG y SP, estos biovars 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 ambos biovars. La secuenciación del genoma completo de SG y SE demostró que alrededor de 125 genes son responsables de las diferencias fisiológicas, incluidos los genes relacionados con los fagos, las fimbrias y las proteínas secretadas de tipo III (De Carli y col., 2017).

6.4. Formación del huevo e infección por *Salmonella* sp.

Las aves producen huevos para su reproducción y para que ello acontezca deben ser fecundados. Si esto no ocurre, la postura se realiza de igual manera y el hombre, en ambas circunstancias, los aprovecha para su consumo. Los huevos de gallinas son los que más se consumen. Los mismos tienen un polo más obtuso que el otro, pesan entre 50 a 70 g siendo la cáscara, en general blanca, amarilla o morena de superficie lisa (Mayer, 1986).

El ciclo de puesta completo dura de 26 a 28 h. La ovulación suele efectuarse por la mañana, unos 30-60 min de la ovoposición anterior. Los rayos rojos visibles de la luz solar o eléctrica que inciden en el ojo, estimulan la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), la cual juega un rol fundamental en la formación del huevo. Esta hormona es transportada por la sangre hasta el ovario. Cuando un óvulo es estimulado por la hormona FSH comienza a desarrollarse hasta alcanzar el saco que encierra a la yema en desarrollo; luego este saco se rompe y se produce la ovulación. Este óvulo cae al infundíbulo (Figura 6), donde tiene o no lugar la fecundación. A continuación, la yema u óvulo llega hasta el magnum (por movimientos peristálticos) donde es rodeada por una espesa clara de huevo o albumina. Luego continúa su recorrido hasta el istmo en donde se añaden agua, algunas sales y las llamadas membranas testáceas. Luego, el óvulo con sus membranas es desplazado hacia la parte inferior del oviducto, lo cual hace que la clara se refuerce en los extremos de la yema, formando las llamadas chalazas. En el útero se forma la capa caliza de la cáscara y también se secreta clara fluida y sales que penetran por ósmosis a través de las membranas de la cáscara. El huevo completo pasa a través de la vagina, donde recibe una capa de mucina lubricante (cutícula), luego llega a la cloaca y finalmente sale al exterior (Torrent Mollevi, 1982; Mountney y Parkhurst, 2001).

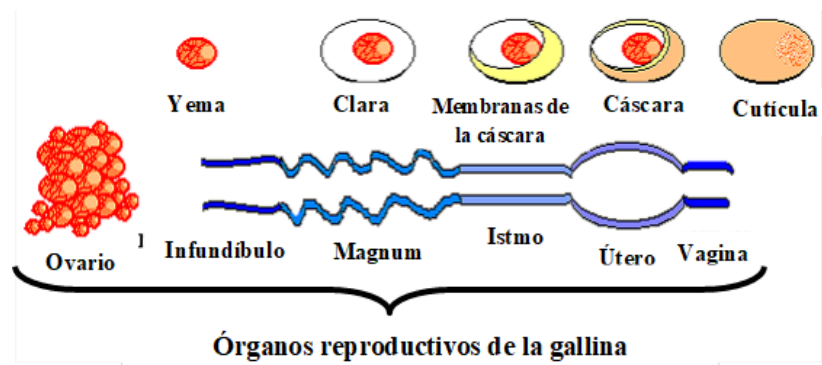


Figura 6. Representación esquemática de los órganos reproductivos de la gallina y su contribución durante la formación del huevo (De Buck., 2004).

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 7). 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.

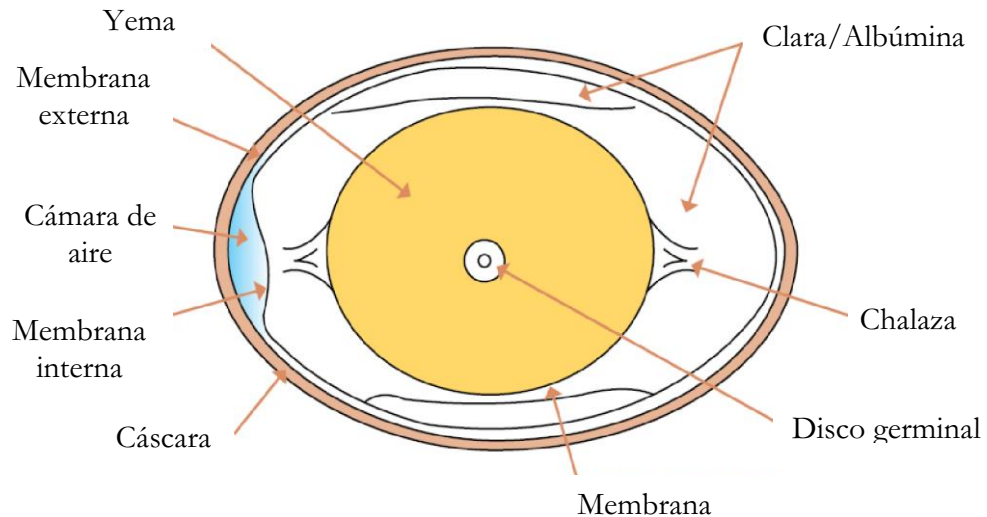


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del huevo (Food Standars Australia New Zeland, 2009).

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 y col., 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 proteínasa inhibitora 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 y col., 2012).

La contaminación bacteriana de los huevos frescos (Figura 8) por contaminación horizontal se debe a la penetración del microorganismo a través de la cáscara desde el intestino de las aves infectadas o por materia fecal contaminada durante o después de la ovoposición (Gantois y col., 2009). Luego de la postura, los huevos están expuestos a una gran variedad de áreas contaminadas, y el alto nivel de materia orgánica húmeda puede permitir la supervivencia y desarrollo de *Salmonella* spp. por proveer protección, así como también una fuente de nutrientes necesarios para su desarrollo (Howard y col., 2011). Sin embargo, *Salmonella* spp. también puede permanecer en ausencia de contaminación, principalmente a bajas temperaturas y humedad relativa (Messens y col., 2006).

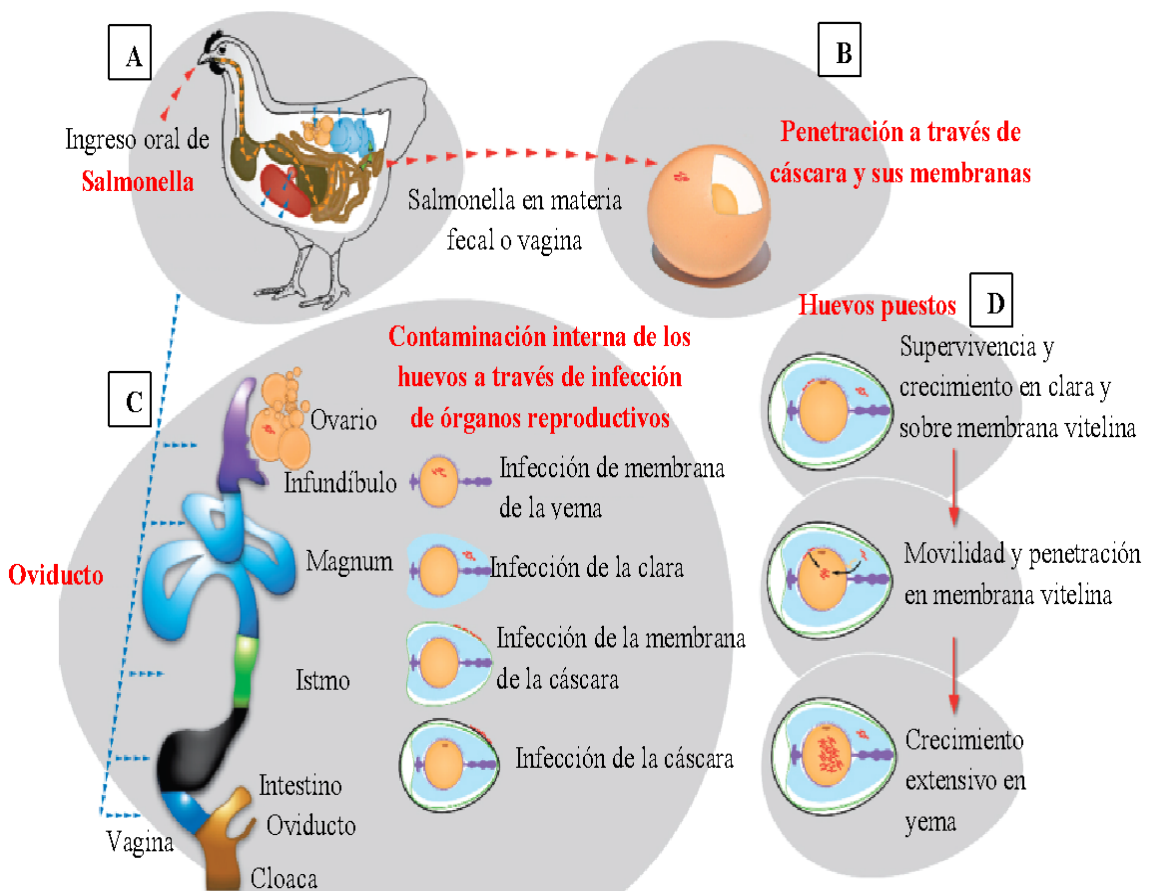


Figura 8. Patogénesis de contaminación del huevo por *Salmonella* sp. **A-** Ingreso por vía oral. **B-** Penetración a través de la cáscara y sus membranas. **C-** Contaminación directa de la yema, clara, cáscara y sus membranas. **D-** Supervivencia y crecimiento dentro del huevo (Gantois et al., 2009).

La contaminación vertical ocurre por contaminación directa de la yema, clara, membranas de la cáscara o cáscara antes de la ovoposición, debido a la infección presente en los órganos reproductivos de la gallina (Gantois y col., 2009). Existen discordancias entre autores con respecto a qué vía de contaminación de huevos es la más frecuente. Barrow y Lovell (1991) afirman que la transmisión horizontal es la forma más importante de contaminación de huevos, mientras que Guard-Pitter (2001) afirma que lo es la transmisión vertical.

Humphrey y col. (1991b), en su estudio con aves contaminadas naturalmente, observaron que numerosas serovariedades de *Salmonella* como SE, ST y S. ser. Heidelberg fueron aisladas desde cáscara de huevo, aunque sólo SE fue aislada desde el contenido del mismo, y solamente un huevo fue positivo en ambos sitios, sugiriendo que es más probable que ocurra la contaminación interna durante su formación que por penetración a través de la cáscara. Howard y col. (2011) reportaron que ST es capaz de sobrevivir dentro del huevo y presentar un crecimiento neto durante 8 semanas de almacenamiento bajo ciertas condiciones de refrigeración.

Gast y col. (2005) indicaron que el ovario a menudo es colonizado por SE más que el oviducto. En este caso SE podría ser capaz de interactuar con las células del folículo antes de la ovulación, aunque también se observó su unión a las células de la granulosa (Howard y col., 2011). Gantois y col. (2008) encontraron que SE aparentemente posee ciertas características que otras serovariedades no poseen, ya que colonizaría el ovario y los folículos mucho más rápido, con la excepción de ST que también sería capaz de colonizar el ovario. La contaminación de la vagina, el istmo o el magnum podría llevar a la incorporación de *Salmonella* dentro de la cáscara, las membranas o la clara, respectivamente (Howard y col., 2011). Estudios experimentales realizados por Gast y Holt (2001) sugieren que *Salmonella* es más probable que se deposite sobre la membrana vitelina que dentro de la yema durante la colonización en el ovario.

Cogan y col. (2001) inocularon SE en la clara de huevos enteros y observaron un crecimiento más rápido que en la clara sola. Además, detectaron un gran número de SE en la yema, demostrando que había una migración hacia la misma. Se cree que las bacterias que son depositadas en la clara, son capaces de migrar, penetrar a través de la membrana vitelina en huevos post-postura alcanzando la yema y adquirir los nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia en huevos que han sido almacenados a temperatura ambiente.

Esto se debería al envejecimiento de la membrana vitelina durante el almacenamiento lo cual genera fuga de nutrientes hacia la albúmina (Gantois y col, 2009).

La presencia de flagelos es un componente necesario para la migración hacia la membrana vitelina en huevos enteros (Gantois y col., 2009). En las cepas no móviles, como SG y SP, se observó que no fueron capaces de crecer en el contenido del huevo, indicando que la motilidad es un factor importante para poder migrar hacia la fuente de nutrientes. De todas maneras, la presencia del flagelo es importante pero no imprescindible, ya que estos dos biovares también pueden contaminar el huevo por transmisión vertical (Cogan y col., 2004).

Algunos autores afirman que la contaminación fecal después de la oviposición es la principal forma de contaminación de los huevos (Gantois y col., 2009). Otros (De Buck y col., 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. En la etapa inicial de la contaminación horizontal, las bacterias se encuentran localizadas entre la cáscara y las membranas; éstas últimas actúan como filtros y representan sólo una barrera temporal para el pasaje hacia el interior del huevo (Messens y col., 2006).

Distintas especies bacterianas parecen tener diferente capacidad para penetrar la cáscara del huevo (Messens y col., 2006). De Reu y col. (2005), compararon la capacidad de penetrar la cáscara de siete cepas bacterianas aisladas de contenido de huevo (*Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes* sp., *Serratia marcescens*, *Carnobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. y SE). Estos autores encontraron que *Pseudomonas* sp., SE 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 y col., 2006). Viora y col. (1993) encontraron que 50 de 100 muestras de maples, que habían sido utilizados en las granjas, estaban contaminadas con SE. Soria (2012) investigó la presencia de *Salmonella* en 452 muestras de maple, encontrando sólo 5 muestras positivas; los serotipos encontrados fueron *S.* ser. Muenchen, *S.* ser. Westhampton, *S.* ser. Agona y SE.

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, la clara posee anticuerpos del tipo IgA e IgM, y por otro lado en la yema del huevo se encuentra la IgY, principal inmunoglobulina

del huevo (Kaspers y col., 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 y col., 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 (Gantois y col., 2009).

7. Detección de *Salmonella* en el laboratorio.

Para las investigaciones epidemiológicas detalladas es necesario identificar las cepas, y tales investigaciones han descansado tradicionalmente en métodos bacteriológicos y serológicos, y en la fagotipificación de algunos serotipos (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 y col., 2006).

Aunque la observación clínica puede sugerir la presencia de la infección por *Salmonella*, 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. 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 *Salmonella* en la producción (Jones y Richardson, 2004), debido a la presencia de proteínas animales y otros ingredientes contaminados (Rose y col., 1999).

Dado que la TA es una enfermedad sistémica, SG puede aislarse de la mayoría de los tejidos corporales. El hígado, el bazo, el saco vitelino y el ciego están más comúnmente involucrados en TA, y son los órganos preferidos para el cultivo. Las lesiones también pueden ocurrir en el corazón, la molleja, el páncreas y los pulmones, que también son

muestras adecuadas para el aislamiento. Si hay lesiones en los órganos reproductivos de las aves maduras, se pueden cultivar los folículos ováricos, y el oviducto. 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 (Shivaprasad, 2000; Chacana y Terzolo, 2003).

7.1. Método de cultivo bacteriológico.

Se debe destacar que existen muchos procedimientos distintos para el aislamiento de *Salmonella*. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones. Por lo tanto, es aconsejable consultar la literatura antes de elegir un método para un determinado propósito y es recomendable la comparación frecuente de los métodos de cada laboratorio con los nuevos métodos que surjan (Caffer y Terragno, 2008).

En general, para estudios de monitoreo, las muestras son procesadas mediante un pre-enriquecimiento no selectivo, en el caso que se considere que las salmonelas se encuentran en bajo número o están potencialmente dañadas. Posteriormente, sigue un enriquecimiento selectivo; luego las muestras se siembran en agares selectivos y diferenciales. Las colonias bacterianas son identificadas como *Salmonella* sp. mediante pruebas bioquímicas y confirmación serológica (Waltman y Gast., 2008). Cuando la TA 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 a veces puede ser aconsejable utilizar modificaciones, de los métodos estándares ya que para algunos tipos de muestras pueden no ser los óptimos (Soria y Bueno, 2016). 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 (del inglés *International Organization for Standardization*, ISO), la Asociación Americana de Salud Pública (del inglés *American Public Health Association*, APHA), la

Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (del inglés *Food and Drug Administration*, FDA), entre otras.

7.1.1. Medios de cultivo para pre-enriquecimiento.

El pre-enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella* sp. es el proceso de inoculación de la muestra en un caldo no selectivo y su incubación durante 18-24 h a 35-37 °C. Estos medios permiten que un escaso número de salmonelas se multipliquen sin que mueran por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento selectivos, o ayudan a la recuperación de las que presentan daños subletales, como los debidos a la congelación, el calentamiento, la exposición a las sustancias microbicidas 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 (APT): es el medio de elección en muchos métodos de referencia (Baylis y col., 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 carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales 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 y col., 2001).

- ✓ Caldo Salmocyst: se utiliza como pre-enriquecimiento no selectivo. Para este medio, el enriquecimiento selectivo se realiza añadiéndole una tableta de Salmosyst suplemento selectivo a una alícuota de 10 ml de caldo de pre-enriquecimiento (Merck, 2005).

- ✓ 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).

7.1.2. Medios de cultivo para enriquecimiento selectivo.

El objetivo del paso de enriquecimiento en medios selectivos es disminuir la concentración de los microorganismos competidores y, al mismo tiempo, aumentar o mantener estable la población de la bacteria de interés. Esto se logra mediante el uso de agentes selectivos y/o condiciones restrictivas para el crecimiento de la flora competitiva, que pueden incluir: el pH del medio de cultivo, la temperatura y/o la atmósfera de incubación, la adición de antibióticos (polimixina B, novobiocina, vancomicina) y de compuestos químicos (verde brillante, selenito de sodio, sales biliares), etc. (Entis, 2002; Soria y Bueno, 2016). Entre los medios de enriquecimiento selectivo empleados en muestras avícolas se encuentran:

✓ Caldo tetracionato: comprende una mezcla de peptonas de carne y de caseína, sales biliares, carbonato de calcio, tiosulfato de sodio, iodo 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 iodo 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 iodo momentos antes de utilizar el medio (Entis, 2002). Para evitar la contaminación del género *Proteus* sp. se puede adicionar novobiocina al medio (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 SP y SG, 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 usados. 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 temperatura selectiva de 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. Gossens y col. (1984) 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 3 gotas del caldo de pre-enriquecimiento en el 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 donde pueden ser selectivamente aisladas. Actualmente, es el medio de elección (Carrique-Mas y col., 2009), empleado en la Unión Europea como único medio de enriquecimiento selectivo para el monitoreo de salmonelas paratíficas (móviles) en las aves de corral, presente en el anexo D de la norma ISO 6579-2002 (hoy ISO 6579-1:2017).

7.1.3. Agares selectivos-diferenciales.

El objetivo en este punto es diferenciar y separar el microorganismo de interés de la microflora competitiva. Esto se hace inoculando el cultivo en un medio sólido, lo que también permite obtener cultivos puros para luego ser utilizados en pruebas para confirmar la identidad microbiana. En general, los medios de aislamiento son selectivos y diferenciales para suprimir parte de la microflora competitiva y distinguir el microorganismo en estudio de los restantes (Gaitan Herrera, 2001; Hanes, 2003; Da Silva y col., 2013).

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). 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 medios agarizados (Figura 9), resultando en altos porcentajes de falsos positivos (Waltman y Gast, 2008). Entre los medios selectivo-diferenciales usados se citan:

- ✓ Agar Mac Conkey: 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* spp. Las bacterias del género *Salmonella* se diferencian del resto de los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* por medio de la fermentación de sacarosa y descarboxilación de lisina. 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 agua 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 (XLD): 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 y col. (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 y col. (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 entérico Hektoen: King y Metzger (1968) formularon este medio de cultivo 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 de la fermentación de carbohidratos (azul de bromotimol y fucsina ácida) y citrato de hierro como indicador de la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato. Soria y col. (2012) emplearon el agar entérico 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 (Yuña y col., 1995).

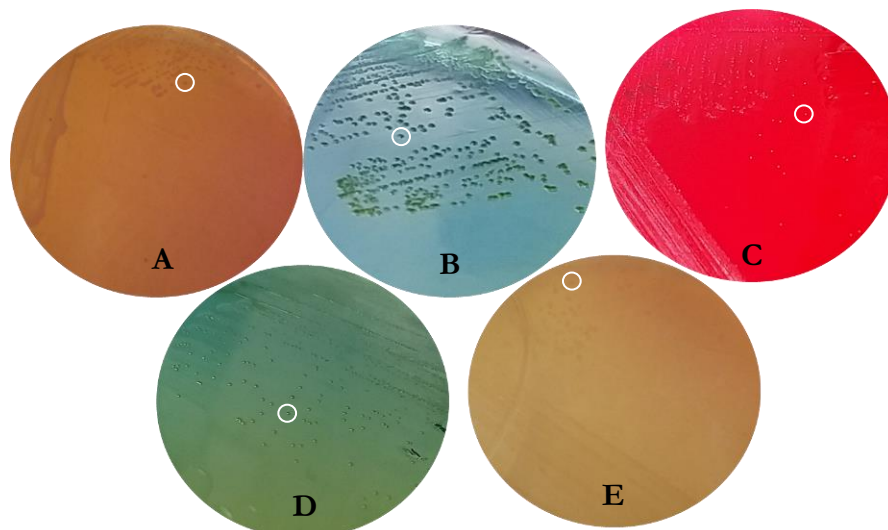


Figura 9. Aspecto de colonias de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum en diferentes medios agarizados selectivos-diferenciales (círculos blancos). A: agar MacConkey. B: agar EF-18. C: agar xilosa lisina desoxicolato. D: agar entérico Hektoen. E. agar *Salmonella-Shigella*.

7.1.4. Confirmación de género mediante pruebas bioquímicas.

El crecimiento de colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* sp. en los agares selectivos-diferenciales permite seleccionarlas para su posterior identificación mediante diferentes pruebas bioquímicas (Figura 10). Generalmente, el uso combinado del agar hierro tres azúcares (por sus siglas en inglés *triple sugar iron* TSI) o agar Kligler (agar hierro dos azúcares) junto al agar lisina hierro (por sus siglas en inglés *lysine iron agar*, LIA) es 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). Por otro lado, existen diferentes pruebas bioquímicas que son útiles para realizar la identificación del género *Salmonella* como ser el agar citrato de Simmons, el agar urea, agar tartrato de Jordan, el medio SIM (sulfuro-indol-movilidad), prueba del ONPG (o-nitrofenil-D-galactopiranosido) y el agar fenilalanina.

✓ El agar TSI fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (H₂S). El medio contiene 1 parte (0,1%) de glucosa y 10 partes (1%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de sulfuro de hierro (FeS). 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 (Anónimo, 2009; Da Silva y col., 2013).

✓ El LIA se usa para la diferenciación de organismos entéricos en función de su capacidad enzimática para descarboxilar (lisina descarboxilasa) o desaminar (lisina desaminasa) lisina y formar sulfuro de hidrógeno en este medio (Anónimo, 2009; Da Silva y col., 2013). *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* spp. de otras bacterias intestinales, tales como *Citrobacter* sp. y *Proteus* sp., ambas similares en TSI (Waltman y Gast, 2008).

✓ El agar citrato de Simmons es una prueba que verifica si la bacteria puede usar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento. Si el organismo tiene el aparato metabólico necesario para asimilar el citrato, se producirá una multiplicación y el medio se volverá alcalino revelado por un cambio en el color del indicador de pH (azul de bromotimol) de verde (neutral) a azul (alcalino). La mayoría de los cultivos de *Salmonella* son citrato positivo, excepto SG y SP (que son negativas a la prueba). (Anónimo, 2009; Da Silva y col., 2013; Andrews y col., 2014).

✓ El agar urea tiene su fundamento en que la urea es una diamina del ácido carbónico, cuya hidrólisis por acción de la ureasa produce 2 moléculas de amoníaco. La ureasa es una enzima que se sintetiza independientemente de la presencia o no de urea. La prueba determina la capacidad de la bacteria en desdoblar la urea con la siguiente alcalinización del medio (Da Silva y col., 2013). En el caso de las aves, en donde predominan las bacterias del género *Proteus*, el agar urea permite diferenciar colonias de *Proteus* (positiva a la prueba color rosado) de las de *Salmonella* (negativa sin cambio de color) que son idénticas en algunos de los medios selectivos y diferenciales (agar *Salmonella-Shigella*, agar XDL).

✓ El agar tartrato de Jordan tiene como fundamento que los microorganismos que utilizan el tartrato de sodio y potasio acidifican el medio que se manifiesta por viraje del indicador rojo de fenol a amarillo en el fondo del tubo (reacción positiva). Cuando no lo utilizan el color del medio no cambia (reacción negativa) (Anónimo, 2009). Esta prueba permite distinguir entre SG (reacción positiva) y SP (reacción negativa) (Chacana y Terzolo, 2003).

✓ El medio SIM pone de manifiesto la movilidad bacteriana, 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 Kovacs. Éste genera un anillo rosado lo que indica una reacción positiva.

✓ La prueba de ONPG demuestra la presencia o ausencia de la enzima β -galactosidasa utilizando el compuesto orgánico *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (Mac Faddin, 1980). De esta manera se puede diferenciar entre los microorganismos con reacción retardada a la lactosa de los que son lactosa negativos. Los resultados esperados para *Salmonella* serían ONPG negativo, a excepción de las subespecies *Arizonae* y *Diarizonae* que son ONPG positivo.

✓ El agar fenilalanina 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 (Da Silva y col., 2013).

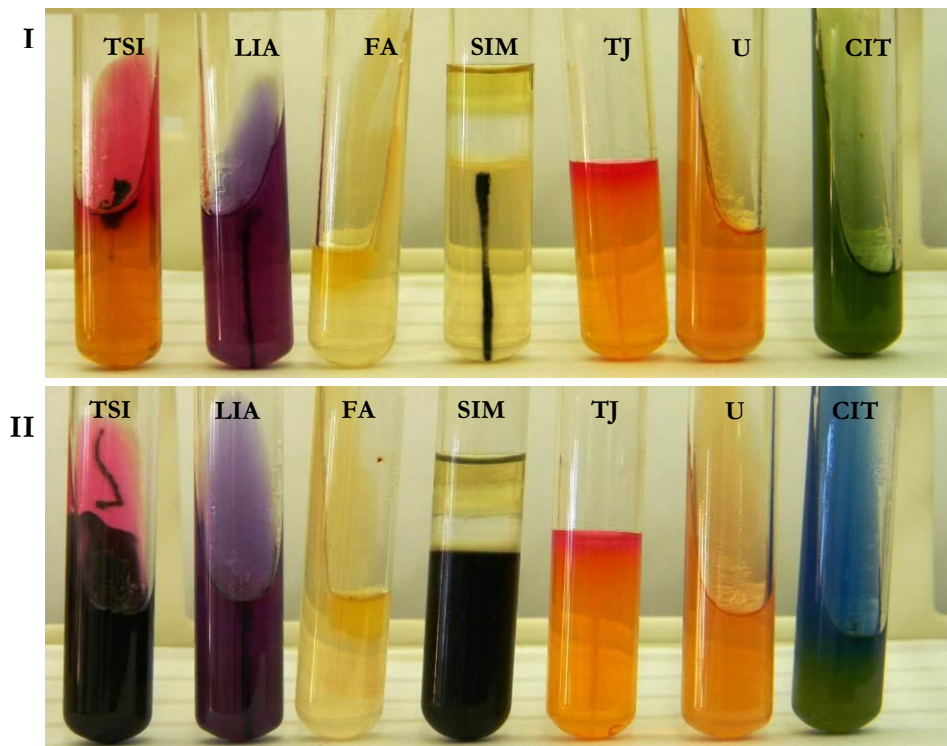


Figura 10. Pruebas bioquímicas para *Salmonella* sp. **I:** *S.* ser. Gallinarum biovar Gallinarum. **II:** *Salmonella* ser. Enteritidis. **TSI:** agar hierro tres azúcares. **LIA:** agar lisina hierro. **FA:** agar fenilalanina. **SIM:** medio Sulfuro-Indol-Movilidad. **TJ:** agar tartrato de Jordans. **U:** agar urea. **CIT:** agar citrato de Simmons.

7.1.5. Serotipificación.

Las serovariedades de *S. enterica* se basan 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*; ya que se lo encuentra sólo en 3 serotipos: *S. ser. Typhi*, *S. ser. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. ser. 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 y col., 2011). Por ejemplo, la fórmula antigénica 4,5,12 (O): i (H1): 1,2 (H2) es la denominación de la serovariedad bifásica ST; 1,9,12 (O): g,m (H1): - identifica a la serovariedad monofásica SE (Hong y col., 2008). Sobre la base de los componentes antigénicos O y flagelares H, se ha establecido lo que se denomina el esquema de Kauffmann-White-Le Minor, que agrupa a todos los serotipos conocidos (Grimont y Weill, 2007).

7.1.6. Métodos rápidos.

Con el advenimiento de las modernas prácticas de producción y comercialización, ha surgido el interés por los métodos rápidos. Los mismos pueden definirse como cualquier método o sistema que disminuye el lapso de tiempo para obtener el resultado de la prueba de identificación. Además de disminuir el tiempo, el objetivo es poder procesar el mayor número de muestras posible, automatizando el trabajo en el laboratorio (Jasson y col., 2010).

Algunos métodos rápidos son:

✓ **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* sp. (Jeníková y col., 2000). 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 y col., 1995). Posteriormente, los microorganismos adheridos a las perlas son capturados y separados del medio de cultivo mediante un dispositivo que contiene imanes (Jeníková y col., 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 (Fredricks y Relman, 1999). La región que va a ser amplificada es específica para los cebadores (primers) seleccionados (Jasson y col., 2010). Rahn y col. (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 y col., 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 y col., 2011). Por ejemplo, las cepas de SE 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 y col., 2010). Diferentes trabajos han sido publicados basando la detección de *Salmonella* por PCR en estos genes de virulencia (Lampel y col., 1996; Dias de Oliveira y col., 2003; Amini y col., 2010). Agrón y col., (2001) diseñaron un par de cebadores específicos para SE, estudiando distintos fragmentos de restricción presentes en el ADN de dicho serotipo y ausentes en otras bacterias. Estos cebadores llamados *sdF I* (por sus siglas en inglés “*Salmonella different fargment*”) fueron útiles para la detección de aislamientos clínicos y ambientales de SE. Por otro lado, Lim y col. (2003) desarrollaron una PCR múltiple para la detección de ST, utilizando tres pares de primers, diseñados para detectar los antígenos O:4, H:i y H:1,2 codificados por los genes *rfbJ*, *fliC* y *fliB*, respectivamente. Los productos amplificados con este set de cebadores fueron altamente específicos para ST. Por otro lado, Kang y col. (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 SG y 21 cepas de SP con un 100 % de sensibilidad. En la misma línea de trabajo, Kang y col. (2012) desarrollaron una PCR triple basada en su trabajo anterior (Kang y col.,

2011), con el cual plantean la diferenciación de las cepas de SG salvajes de la cepa vacunal 9R.

7.1.7. Tipificación molecular.

Más allá de los métodos fenotípicos de tipificación, hay estudios, como por ejemplo los epidemiológicos, que requieren un método de tipificación de los microorganismos con mayor poder discriminatorio. Para ello se utilizan métodos de tipificación molecular que se basan en las diferencias a nivel genético (diferencia en la secuencia de ADN, Fendri y col., 2013). Las técnicas moleculares, que analizan propiedades o polimorfismos genéticos en los microorganismos, han ampliado notablemente el campo de la tipificación en microbiología. La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos (Coll y col., 2005).

Estos tipos de estudios tienen por objetivo determinar la relación clonal (hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común) que existe entre varios aislamientos de una misma especie (Tenover y col., 1995). Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva, entre otros beneficios (Coll y col., 2005). Merece también especial mención, la diseminación horizontal entre bacterias (del mismo o distinto taxón) de plásmidos o elementos genéticos potencialmente móviles (transposones, integrones) que contengan secuencias relevantes epidemiológicamente, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos o de virulencia.

Los métodos moleculares aplicados al estudio epidemiológico pueden dividirse en los siguientes análisis (Van Belkum y col., 2001, Soll y col., 2003):

✓ **Análisis de ADN extracromosómico:** esta técnica permite estudiar cambios en el ADN ya sea por mutación o por la adquisición de elementos de transmisión horizontal (ETH) como plásmidos, transposones o integrones, capaces de transmitirse entre microorganismos de la misma o de distinta especie. El aumento de la resistencia a un determinado antibiótico puede ser debido a la diseminación de un clon o de un ETH entre distintas cepas.

✓ **Análisis de ADN cromosómico:** se analiza el polimorfismo de los fragmentos resultantes de la amplificación por PCR de regiones consenso intergénicas repetitivas de las Enterobacterias (ERIC, por sus siglas en inglés *Enterobacterial repetitive intergenic consensus*). Las secuencias de ERIC son palíndromos imperfectos de 126-127 pares de bases. La característica distintiva de las secuencias de ERIC es que se encuentran en las regiones intergénicas dentro de las regiones transcritas (Wilson y Sharp, 2006). La presencia de secuencias ERIC ha resultado útil para el desarrollo de técnicas de caracterización molecular, especialmente para revelar las relaciones filogenéticas entre los organismos a estudiar. Estos métodos de subtipificación de bacterias son extremadamente confiables, rápidos y altamente discriminativos (para ciertas bacterias), así como reproducibles (Lang y col., 2013).

✓ **Macrorrestricción de ADN cromosómico:** dentro de estas técnicas tenemos la técnica de electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE, por sus siglas en inglés *pulsed-field gel electrophoresis*). A través de la utilización de enzimas de restricción de bajo poder de corte, se digiere el genoma completo de la bacteria. Se obtienen así patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas. Da información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto (Coll y col., 2005).

✓ **Amplificación de secuencias genéticas con o sin restricción posterior del producto obtenido:** se encuentran aquellas que analizan el polimorfismo de los fragmentos generados. Por lo general, posee un bajo poder de discriminación para utilizarse como marcador epidemiológico. Sin embargo, en algunos casos se utilizan para definir especies dentro de un género determinado. También dentro de este grupo se encuentra la PCR con digestión con enzimas de restricción de baja (IRS) o alta (AFLP) frecuencia de corte posterior a la amplificación (Coll y col., 2005).

✓ **Análisis de ADN por secuenciación:** aquí tenemos la PCR con posterior secuenciación (MLST, por sus siglas en inglés *Multilocus Sequence Typing*). Es un marcador molecular (Coll y col., 2005) de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente), aunque ha sido ocasionalmente utilizado para

dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc).

7.1.8. Métodos serológicos.

Pueden establecerse pruebas serológicas para determinar la presencia de las bacterias causantes de la enfermedad en un grupo de aves. Estas pruebas son adecuadas para identificar la presencia y estimar la prevalencia de la infección en una granja. La prueba utilizada en el campo es la prueba rápida de aglutinación en placa de sangre entera. En el laboratorio se emplea una prueba de aglutinación de suero, como prueba rápida en placa o como prueba en tubo. En cualquier animal que dé reacción positiva se debe confirmar la infección mediante un cultivo en un examen postmortem. Existen técnicas de enzimoimmunoanálisis para algunos serovares de *Salmonella*, entre ellos SE, pero no para SG y SP. Sin embargo, es necesario confirmar la enfermedad aislando los microorganismos (OIE, 2018).

Tanto SP como SG poseen los antígenos O-9 y O-12 y también pueden poseer el antígeno O-1 (Brooks y col., 2012). Sin embargo, en el caso de SP, hay una variación en la relación de 12₁, 12₂ y 12₃; la cepa estándar contiene más 12₃ que 12₂, mientras que sucede lo contrario con la forma variante. También existen formas intermedias, que en SG no existen. Debido a esta variación, es necesario utilizar un antígeno polivalente en las pruebas de inmunodiagnóstico. El mismo antígeno se utiliza para detectar SP y SG. Dentro de las pruebas serológicas, se encuentran (OIE, 2018):

✓ **Prueba rápida de aglutinación de sangre entera:** se puede utilizar en condiciones de campo para detectar tanto SP como SG. 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.

✓ **Prueba de seroaglutinación:** se lleva a cabo de la misma manera que la anterior con la excepción de sustituir la sangre entera por suero.

✓ **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.

✓ **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 SE posee el mismo antígeno somático del grupo D que SP/SG, la prueba de sangre completa para SG y SP y otras relacionadas pueden utilizarse en el diagnóstico de la infección (OIE, 2008). El problema de las pruebas serológicas es que en las infecciones subclínicas puede no producirse un nivel de anticuerpos detectables (Gast, 2008).

En el caso de TA, la serología es usada debido a que SG no se excreta constantemente por las heces, a diferencia de los serotipos móviles de *Salmonella* causantes de ETA. Por otro lado, SG también es altamente invasiva de manera que después de la infección oral, y la diseminación se pueden detectar anticuerpos circulantes (Barrow y col., 1992).

8. Parámetros bioquímicos en infección por *Salmonella ser. Gallinarum*.

Para poder detectar las formas clínicas y subclínicas de las enfermedades en las aves es necesario realizar un correcto diagnóstico diferencial. La medición de los parámetros hematológicos brinda una información muy valorable para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y es usado rutinariamente en medicina humana y veterinaria (Nazifi y col., 2011).

Desafortunadamente, debido a la poca información, el perfil hematológico no ha sido ampliamente usado en las aves (Talebi y col., 2005). Con respecto a los elementos formes de la sangre, las aves tienen 5 tipos de glóbulos blancos: heterófilos (que son homólogos a los neutrófilos de los mamíferos), linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos (Jain, 1993). Los heterófilos son los leucocitos fagocíticos primarios y proliferan en circulación en respuesta a infecciones, inflamación y estrés (Jain, 1993; Campbell, 1995; Davis y col., 2008). Los linfocitos están involucrados en una variedad de funciones inmunológicas, como la producción de inmunoglobulina y la modulación de la defensa inmune (Campbell, 1996). El 20 % restante de los leucocitos representa una combinación de eosinófilos, que juegan un papel en el proceso de inflamación (Jain, 1993) y están asociados con la defensa contra los parásitos (Kiesecker, 2002; Davis y col., 2008); monocitos, que son de larga vida, células fagocíticas asociadas con la defensa contra infecciones y bacterias (Campbell, 1995; Davis, Cook y Altizer 2004) y basófilos, cuya función no se entiende claramente pero se cree que desempeñan un papel importante en las reacciones inflamatorias tempranas y de hipersensibilidad inmediata, pero se diferencian de

las de los mamíferos al no contribuir a la hipersensibilidad retardada.(Campbell, 1995; Maxwell and Robertson, 1995; Calhoun, 2008). El perfil basal de leucocitos varía considerablemente entre los taxones de vertebrados. En mamíferos, por ejemplo, el leucocito más abundante es el neutrófilo, mientras que los linfocitos suelen ser los más comunes en las aves (Davis y col., 2008).

Por otro lado, muchos factores, tales como el tipo genético, el alimento, el clima, la edad, el estado fisiológico, el sexo, los factores patológicos, la hora del día, etc., pueden modificar los niveles de diferentes parámetros bioquímicos como proteínas totales (PT), albúmina (Alb), actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST); como así también el recuento diferencial de leucocitos (Meluzzi y col., 1992).

García y col. (2010) evaluaron los cambios histopatológicos y los componentes del suero de gallinas infectadas con SG durante diez días. Estos autores encontraron que las PT disminuyeron a partir del tercer día, las concentraciones de Alb mostraron alteraciones en el quinto día post inoculación. Esta disminución 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.

Por otro lado, Freitas Neto y col. (2007) observaron en aves infectadas experimentalmente con SG, que el porcentaje de leucocitos aumentó después del 7mo día post-infección en aves coloradas semipesadas, mientras que en aves blancas incrementaron al 9no día post-infección. Con respecto a parámetros bioquímicos sanguíneos, observaron un incremento en la actividad de AST en las aves coloradas semi-pesadas al 5to día post-infección, mientras que en las aves blancas la actividad de AST incrementó en los días 5, 7, 12 y 14 post-infección con SG.

Chiroma y col. (2017) encontraron un incremento en la actividad de AST y ALT en gallinas ponedoras infectadas artificialmente con SG, sugiriendo que estos niveles son buenos indicadores del daño hepático. Además, observaron un leve incremento en las PT entre los 4-7 días post-infección, pero entre los 14-35 post-infección estos niveles disminuyeron. Estos autores sugieren que el aumento de PT se debe a una deshidratación de las aves afectadas mientras que el aumento posterior estaría asociado a una falla hepática llevando a una hipoproteinemia.

9. Leucocitos fecales.

Las formas invasivas de gastroenteritis bacteriana, como las producidas por *Salmonella*, a menudo causan inflamación intestinal, mientras que la mayoría de las formas con etiologías virales, parasitarias y mediadas por toxinas no lo hacen en los seres humanos (Gill y col., 2003). *Salmonella* induce una respuesta inflamatoria con diarrea y edema, sangrado variable de la mucosa de intensidad, quimiotáxis leucocitaria e infiltración. Esta diarrea implica la presencia de leucocitos en las heces (Huicho, 1995).

Por otro lado, se sabe en que la infección de ST y SE produce una fuerte respuesta inflamatoria, que puede limitar la propagación de *Salmonella* en gran medida al intestino, mientras que SG no induce una respuesta inflamatoria y, por lo tanto, puede no estar limitada por el sistema inmunitario, lo que lleva a la enfermedad sistémica severa de las aves (Kaiser y col., 2000). Los análisis rápidos de heces disponibles actualmente incluyen el examen microscópico de leucocitos y eritrocitos y un análisis inmunológico rápido para la detección de lactoferrina fecal en humanos (Gill y col., 2003). Sin embargo, hay una falta de información sobre este tipo de análisis para enfermedades de *Salmonella* en aves de postura.

Un exámen que puede realizarse es la coloración del extendido fecal en busca de leucocitos fecales, lo que requiere un profesional experto que examine rápidamente en el microscopio la muestra fecal. Los leucocitos se tiñen para que se distingan claramente en los restos fecales (Guerrant y col., 1992). Soria y col. (2015) observaron que extendidos fecales de aves de postura con más de 5 leucocitos fecales por campo presentaron un incremento en el porcentaje de heterófilos, relación heterófilo/linfocito y en los valores de AST con una disminución en el recuento de linfocitos comparados con los extendidos fecales con menos de 5 leucocitos fecales por campo.

10. Sensibilidad a los antimicrobianos.

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

informaron una lista de agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento. Los agentes antimicrobianos más enumerados a estos efectos fueron bacitracina y tilosina, que, de acuerdo con la “Lista de la OIE de agentes antimicrobianos de importancia veterinaria”, se clasifican como agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada y agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica, respectivamente. La colistina fue mencionada por 12 países (Figura 11).

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

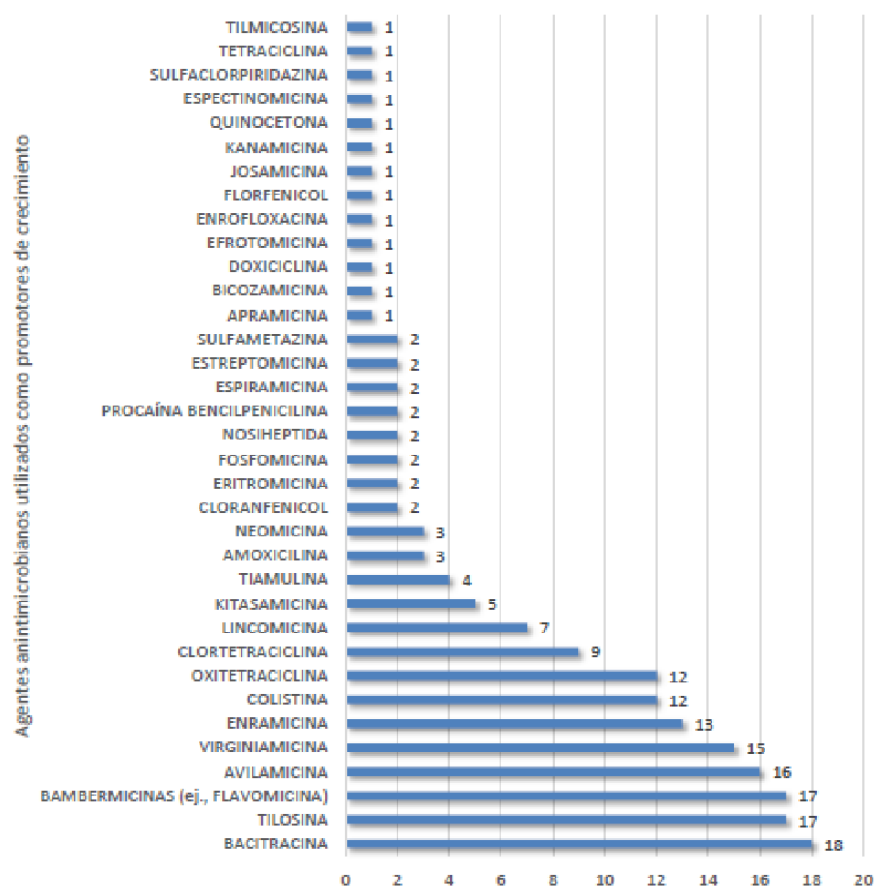


Figura 11. Agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento en animales durante el año 2017 (OIE, 2018a).

Alcaine y col. (2007) informaron que de las 10 serovariedades de *Salmonella* sp. comúnmente reportadas por el CDC, aisladas de infecciones humanas en los Estados Unidos, al menos 8 aislamientos mostraron resistencia a 5 o más antimicrobianos. Estos autores observaron que ST presentó 1 o 2 patrones de multiresistencia, incluyendo resistencia a antimicrobianos de los grupos de β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos e inhibidores de la vía del folato. Para *S* ser. Heidelberg se observó multiresistencia a antimicrobianos de los grupos de β -lactámicos, β -lactámicos + inhibidores de β -lactamasas y cefalosporinas. Aunque SG es un huésped adaptado a especies de aves y presenta un riesgo zoonótico mínimo (Shivaprasad, 2000), el incremento de la resistencia a los antimicrobianos en esta bacteria se ha convertido en un problema (Kang y col., 2010).

Lee y col. (2003) reportaron que SG en 1995 era susceptible a la mayoría de los antibióticos convencionales. Sin embargo, cepas aisladas en el año 2001 fueron resistentes a varios de ellos. Por otro lado, Kang y col. (2010) informaron que 105 aislamientos de SG, obtenidos de pollos entre 2002 y 2007, demostraron 30 patrones de resistencia antimicrobiana diferentes. De estos 105 aislamientos, 103 (98,1%) eran resistentes al ácido nalidíxico y 99 (94,3%) eran resistentes o resistentes de forma intermedia a la enrofloxacin y ciprofloxacina.

Por lo antes expuesto, el comité internacional de la OIE (2019) unificó los criterios para la clasificación de los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria dividiéndolos en agentes antimicrobianos de importancia crítica, agentes de importancia elevada y agentes de importancia. Dentro de la categoría de **agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica** de la lista de la OIE, algunas clases son de importancia crítica tanto para la salud humana como para la sanidad animal, como es actualmente el caso de las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación. En 2016, la colistina se agregó a la categoría de agentes antimicrobianos de importancia crítica y de prioridad máxima de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Por lo tanto, el uso racional de los antimicrobianos debe basarse en el conocimiento de las estructuras y las vías bioquímicas dentro de las bacterias y de las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los mismos. Esto implica considerar la manera en que los medicamentos actúan para inhibir el crecimiento o matar a los microorganismos y el grado en que los medicamentos son capaces de penetrar en los sitios de infección *in vivo* (AliAbadi y Lees, 2000).

10.1. Resistencia a antibióticos.

Una ruta eficiente en la adquisición de resistencia a los antimicrobianos es a través de elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos, transposones e integrones (Cabrera y col., 2006). Las cepas multirresistentes resultantes por la adquisición de estos elementos genéticos han sido encontradas en todo el mundo y son una gran preocupación en la salud pública y la inocuidad de los alimentos (Alcaine y col., 2007).

La resistencia a los antibióticos es la capacidad que tienen los microorganismos de resistir al efecto de dichos fármacos, es decir que los microorganismos no mueren, y su crecimiento no se detiene. Las bacterias encuentran inevitablemente maneras de resistir a los antibióticos creados para destruirlos, haciéndolos ineficaces; por lo que es necesario evitar el desarrollo de una nueva forma de resistencia a través de cambios genéticos e impedir que la que resistencia que ya existe se propague (Dominguez, 2016).

La detección y monitoreo de la multirresistencia es importante para modificar la selección de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas como la salmonelosis y para evaluar el riesgo de expansión de cepas multirresistentes (Yang y col., 2002; Grazziani y col., 2007). Por lo tanto, determinar el impacto de estas bacterias resistentes es un desafío permanente, ya que muchas clases de antimicrobianos utilizados en animales destinados a alimentos son análogos a los usados en la terapéutica humana y por lo tanto eso llevaría a seleccionar fenotipos de resistencia similares (CDC, 2012).

El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos puede ser (Alanis, 2005):

✓ **Intrínseca (espontánea)**, basada en las mutaciones de genes codificados sobre el cromosoma bacteriano, que ocurre de forma espontánea en ausencia de presión de selección antimicrobiana.

✓ **Adquirida**, cuando un nuevo material genético es intercambiado entre los organismos. Esto se produce cuando al menos una bacteria dentro de un grupo heterogéneo lleva el determinante capaz de expresar la resistencia al antibiótico.

Ambos tipos de resistencia espontánea o adquirida, se puede transmitir horizontalmente o verticalmente. La transmisión horizontal de la resistencia puede ocurrir a través de varios mecanismos, es decir el material genético puede ser transferido entre los microorganismos a través de tres rutas principales (Figura 12):

✓ **transformación**: algunas bacterias son capaces de captar ADN libre desde el ambiente e incorporarlo a su cromosoma;

✓ **transducción:** donde virus que infectan bacterias (bacteriófagos) median la transferencia de ADN entre bacterias vía la transducción, en el cual ADN de una bacteria donante es empaquetado en la partícula del virus y es transferido a una bacteria receptora, durante la infección;

✓ **conjugación:** es el mecanismo de transferencia de genes responsable de los aspectos más preocupantes de la resistencia antimicrobiana. Se forma un pilus sexual (pequeño tubo) entre dos células bacterianas a través del cual se transfiere ADN plasmídico.

Estas mutaciones o genes de resistencia pueden acumularse en ciertas especies bacterianas patógenas que conducen a fenotipos complejos cada vez más reconocidos en todo el mundo (Pournaras y col., 2010; Freitas y col., 2011). En general, se denominan bacterias resistentes a múltiples fármacos y, debido a esta particularidad, pueden sobrevivir bajo la acción de diferentes compuestos antimicrobianos, lo que aumenta la oportunidad de propagación (Cantón y col., 2003).

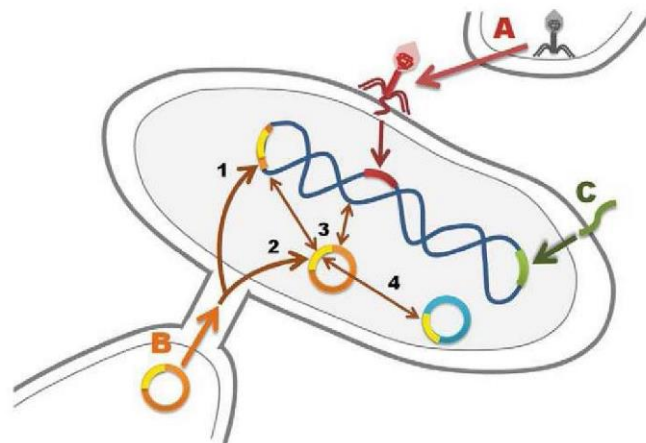


Figura 12: Mecanismos de transmisión genética entre bacterias. A- Transducción: inserción de ADN mediante un bacteriófago. B- Conjugación: el plásmido de la bacteria dadora se transfiere a la receptora mediante la formación de un pilus. 1- El plásmido se puede insertar en el cromosoma bacteriano. 2- El plásmido puede quedar libre en el citoplasma bacteriano. 3- Distintos estados del ADN plasmídico, libre o integrado al cromosoma bacteriano. 4- El plásmido puede intercambiar material genético como secuencias de inserción o transposones con otros plásmidos o con el cromosoma. C- Transformación: adquisición de ADN libre desde el medio (Gyles y Boerlin, 2014).

Se han utilizado diferentes definiciones para bacterias resistentes a múltiples fármacos. Una iniciativa conjunta del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, (ECDC) y el CDC redefinió recientemente. Estas definiciones se establecen a nivel fenotípico, pero no consideran los aspectos genéticos de los mecanismos de resistencia involucrados (Magiorakos y col., 2011).

✓ **resistente a múltiples fármacos** (MDR, por sus siglas en inglés *Multi-Drug Resistance*): es la resistencia al menos a un agente perteneciente a tres o más categorías antimicrobianas.

✓ **ampliamente resistente a los medicamentos** (XDR, por sus siglas en inglés *Extensively-Drug -Resistance*): es la resistencia al menos a un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto a uno o dos de ellos (es decir, los aislamientos bacterianos siguen siendo susceptibles a solo una o dos categorías).

✓ **pandrogia resistente** (PDR, por sus siglas en inglés *Pan Drug -Resistance*): es la resistencia a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos.

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

✓ **"co-resistencia"**: implica la transferencia de varios elementos genéticos al mismo aislamiento bacteriano y/o la adquisición de mutaciones en diferentes *loci* genéticos que afectan a diferentes fármacos antibacterianos.

✓ **"resistencia cruzada"**: se produce por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia que afectan a agentes antimicrobianos de la misma clase.

✓ **"resistencia pleiotrópica"**: afecta a varias clases de antimicrobianos debido al mismo evento genético, como la mutación o la adquisición de un gen de resistencia.

Los patrones de sensibilidad de aislamientos de SG obtenidos de aves de corral en Corea han cambiado continuamente después del brote de TA en 1992. Park y col. (1995) informaron que 84 aislamientos de SG de 1992 a 1996 fueron todos susceptibles a la gentamicina, ampicilina y kanamicina, mientras que Oh y col. (2000) informaron que el 54,5 % de 103 aislamientos de SG de 1998 a 1999 fueron susceptibles a la gentamicina, y la incidencia de aislamientos multirresistentes a más de cinco medicamentos fue de 68,3 %. Lee y col. (2003) informaron que la incidencia de aislamientos de SG sensibles a la ampicilina se redujo significativamente del 100 % en 1995 al 13,0 % en 2001.

En las infecciones por SG, las fluoroquinolonas se usan ampliamente debido a la ventaja de la administración oral y la alta potencia. Estos antimicrobianos se han utilizado con éxito para tratar la salmonelosis, incluidas las infecciones causadas por cepas multirresistentes (Barnass y col., 1990; Reina y col., 1993). Seo y col. (2019) estudiaron las características moleculares de la resistencia antimicrobiana de aislamientos de SG de pollos en Corea y observaron altas tasas de resistencia a ácido nalidíxico (78,5 %), gentamicina (52,3 %) y ciprofloxacina (26,9 %) en cepas correspondientes al año 2018. Por otro lado,

Kang y col. (2010) en la mayoría de los aislamientos de SG también observaron resistencia a ácido nalidíxico y fluoroquinolonas.

En Argentina, ante la importancia del uso responsable de antimicrobianos en animales, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2015) creó el Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en animales destinados al consumo humano para prevenir la generación y difusión de bacterias que resisten la acción de los fármacos que las controlan. La medida está contemplada en la Resolución Senasa 591 del 24 de noviembre de 2015. El programa busca determinar y monitorear la resistencia a diferentes antimicrobianos en bacterias comensales y zoonóticas para evaluar la implementación de posibles medidas que puedan retrasar o impedir la emergencia y diseminación de bacterias resistentes, y así minimizar su riesgo en la salud pública y animal.

10.1.1. Resistencia a antibióticos β -lactámicos.

Estos compuestos químicos deben su nombre a la presencia de un anillo de cuatro átomos, denominado anillo β -lactámico, que define químicamente a esta familia y que pueden tener acoplado un segundo anillo. Se caracterizan por presentar baja toxicidad, alta eficacia y son ampliamente prescritos (Dominguez, 2016).

La resistencia a antibióticos β -lactámicos puede producirse por distintos mecanismos (Drawz y Bonomo, 2010):

- ✓ Modificación de las dianas (proteínas PBP, del inglés *protein binding penicillin*) o síntesis de moléculas alternativas.
- ✓ Modificación de la membrana bacteriana mediante la reducción de la permeabilidad al antimicrobiano.
- ✓ Expulsión activa del antibiótico fuera de la célula.
- ✓ Presencia de enzimas específicas que modifican o producen la inactivación enzimática del antibiótico antes o después de penetrar en la bacteria, por las denominadas β -lactamasas.

La presencia de enzimas β -lactamasas, es uno de los mecanismos más importante de resistencia en bacterias Gram negativas, especialmente en las enterobacterias (Poole, 2004, Kong y col., 2010). Uno de los grupos de enzimas epidemiológicamente “exitosos” son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), capaces de producir la hidrólisis de las penicilinas, cefalosporinas de primera (C1G), segunda (C2G) y tercera generación (C3G), y monobactamas (Bonnet, 2004). Posteriormente se comenzaron a describir,

microorganismos resistentes a cefotaxima, debido a la presencia de las enzimas CTX-M, las cuales actualmente representan las BLEE prevalentes a nivel mundial. Estas enzimas tienen principalmente actividad sobre la cefotaxima y no sobre la ceftazidima; aunque en los últimos años la emergencia de variantes de CTX-M (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 y CTX-M-19) presentan actividad frente a ceftazidima. Las BLEE han sido reportadas en bacterias Gram negativas, más comúnmente en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Proteus mirabilis*, aunque también en *Salmonella* sp., *K. oxytoca*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. (Dominguez, 2016; Sadeeq y col., 2018).

10.1.2. Resistencia a quinolonas.

Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos caracterizados por una estructura bicíclica hetero-aromática, constituida por un núcleo piridona- β ácido carboxílico y un anillo aromático. El ácido nalidíxico (AN, quinolona de primera generación) es el representante principal de este grupo. Por otro lado, el AN fue relegado a un segundo plano con la síntesis de 6 fluoroquinolonas (FQ), las cuales presentan un átomo de flúor en la posición 6 del anillo central (Mella y col., 2000). De esta manera las FQ poseen una mayor capacidad de penetración a la célula bacteriana, mayor afinidad, lo que propicia un aumento de la potencia y el espectro antibacteriano (Dominguez, 2016).

Las quinolonas interfieren en la replicación del ADN al bloquear o inhibir las enzimas ADN topoisomerasa II y topoisomerasa IV. La ADN-girasa es una topoisomerasa II (cuya función es de mantener un nivel de enrollamiento del ADN). Es un tetrámero que posee dos subunidades, GyrA y dos subunidades, GyrB, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Esta enzima es la diana primaria de las quinolonas en bacterias Gram negativas (Hawkey, 2003).

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia para este grupo de antibióticos: cromosómico y plasmídico. Dentro del primero, se encuentran las mutaciones en las topoisomerasas dianas, expulsión activa del antibiótico del interior de la célula y la disminución de la permeabilidad de la membrana. Por otro lado, dentro de los mecanismos plasmídicos comprenden la protección de las topoisomerasas diana por las proteínas Qnr, modificación enzimática del antibiótico y expulsión activa del mismo mediante bombas de eflujo (Hawkey, 2003; Giraud y col., 2006).

El mecanismo principal de resistencia a quinolonas en bacterias Gram negativas se debe principalmente a sustituciones aminoacídicas generadas por mutaciones en las regiones

denominadas QRDR (Región determinante de resistencia a quinolona, por sus siglas en inglés, *Quinolone Resistance Determining Region*), localizadas principalmente en GyrA y ParC. Tanto en *E. coli* como en *Salmonella* sp. se encuentran mutaciones asociadas a la resistencia a las quinolonas agrupados en una región específica del gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la girasa, el cual es el objetivo primario de las quinolonas (Hawkey, 2003; Giraud y col., 2006; Dominguez, 2016).

11. Residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano (antimicrobianos).

Los medicamentos veterinarios, especialmente los antibióticos, se encuentran entre los compuestos más importantes relacionados con la producción de alimentos para animales. El uso de antibióticos en animales de producción es muy superior a la de humanos, aunque la recopilación de datos sobre el uso de antibióticos en algunas regiones está poco documentada, se estima que el consumo veterinario mundial de antibióticos en 2013 fue de alrededor de 131,000 toneladas (Ritchie, 2017).

Los antibióticos se administran a los animales de diferentes maneras: oral, parenteral o tópica. Se sabe que los niveles de residuos que se producen a partir de fuentes inyectables son mayores que los resultantes de la alimentación (Katz y Brady, 2000). Si bien algunos antimicrobianos pueden eliminarse rápidamente, otros o no se metabolizan o no son excretados fácilmente, por lo que quedan como residuos en los tejidos de los animales y por lo tanto ingresan a la cadena alimentaria, constituyendo un riesgo para los consumidores (Dipeolu y Alonge, 2002). Estos residuos pueden causar diversos efectos, como la transferencia de bacterias resistentes a los antibióticos a los humanos, alergia, efectos inmunopatológicos, carcinogenicidad (sulfamidazina, oxitetraciclina, furazolidona), mutagenicidad, nefropatía (gentamicina), hepatotoxicidad, trastornos reproductivos, toxicidad de la médula ósea (cloranfenicol) e incluso shock anafiláctico en humanos (Nisha, 2008; Darwish y col., 2013). Por lo tanto, los tiempos de espera entre el tratamiento y el sacrificio de los animales deben ser respetados para prevenir los residuos peligrosos en carne y huevos con destino a consumo humano (Anadón Navarro, 2007).

Van Boeckel y col. (2015) reportaron el ranking de países que utilizan antibióticos en animales de producción, donde China fue el primer país con un porcentaje del 23 %. El orden de otros países fue el siguiente: Estados Unidos (13 %), Brasil (9 %), India (3 %) y Alemania (3 %).

Por otro lado, la contaminación directa del alimento derivado de animales puede ocurrir por el agua durante el procesamiento, almacenamiento y transporte. La presencia de antibióticos en los alimentos para aves es un ejemplo de contaminación indirecta (Nisha, 2008). Además, el alimento puede contaminarse con el guano de las aves, ya que la droga se puede excretar en las heces de los animales tratados, y, por lo tanto, pueden contaminar el alimento de otros animales no tratados (Darwish et al., 2013).

La detección de estos residuos puede realizarse mediante diferentes pruebas. Existen métodos de detección de residuos de antibióticos realizados mediante ensayos microbiológicos o inmunoensayos. Los ensayos microbiológicos pueden ser cualitativos o semicuantitativos basados en una reacción específica entre un organismo susceptible y el antibiótico (Dey y col., 2005; Kilinc y col., 2007; Cháfer-Pericás y col., 2010).

12. Bioseguridad e identificación de factores de riesgo en granjas.

Van Hoorebecke y col. (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* sp. dentro de las granjas. Cualquier factor que predisponga a la población de animales a la presencia de enfermedades se denomina factor de riesgo. En Argentina la resolución N^o 542/10 (SENASA, 2010), hoy reemplazada por la resolución N^o 1699/2019, estipula los requisitos de bioseguridad, higiene y manejo sanitario para la habilitación sanitaria de establecimientos avícolas de producción comercial tales como establecimientos de producción de huevos para consumo y demás tipos de producciones avícolas. A diferencia de la resolución promulgada en el año 2010, la nueva resolución posee algunos puntos nuevos como ser (SENASA, 2019a):

- a. Los establecimientos deben tener sistemas de desinfección para calzados y equipamiento para el lavado de manos al ingreso y egreso de los galpones.
- b. Las granjas de postura deben contar con un depósito de huevos separados de la granja.
- c. Todo establecimiento de producción comercial de aves debe estar respaldado por un equipo de sacrificio sanitario, que elimine la totalidad de sus aves.
- d. El equipo de sacrificio debe garantizar la aplicación de un método indoloro, que consiga una rápida inconciencia y muerte, que requiera una mínima inmovilización, evite la excitación, sea irreversible y minimice el estrés animal. Asimismo, debe garantizar la

seguridad de los operarios, así como de otras especies animales que se encuentren en la explotación.

e. Todo establecimiento de producción comercial debe disponer e indicar un lugar físico dentro o cercano a su predio, donde se procederá a realizar el enterramiento de sus aves ante la implementación de sacrificio sanitario.

f. Todos los establecimientos avícolas deben disponer de manuales de buenas prácticas de manejo, higiene y bioseguridad.

g. Todas las granjas (aves para carne, de huevos para consumo, y los núcleos de aves reproductoras) deben cumplir con un período de descanso sanitario obligatorio, comprendido entre la salida de las últimas aves del lote y la entrada de las primeras aves del siguiente. Durante dicho período se deben realizar las tareas de tratamiento de cama usada o guano, limpieza, desinfección, desinsectación, desratización y preparación para la entrada del nuevo lote. El tiempo mínimo exigido es inicialmente de diez (10) días.

h. Los establecimientos deben dar cumplimiento a los eventuales muestreos de verificación sobre la presencia de residuos de productos veterinarios y contaminantes.

i. Cuando los establecimientos de aves de huevo para consumo no registran movimientos o falta de antecedentes sanitarios registrados en el sistema del SENASA por un período de dos (2) años de otorgada la habilitación sanitaria correspondiente es causal de la cancelación de dicha habilitación.

Las medidas de protección y prevención sanitaria que la granja debe adoptar para una producción segura, se enmarcan dentro de las medidas de bioseguridad que sean adoptadas. La palabra “bioseguridad”, para los productores avícolas, puede significar la diferencia entre la salud y la enfermedad de sus lotes. Si el lote se encuentra sano, aumenta la producción y con ello, los beneficios (USDA, 2006).

Un buen plan de bioseguridad es como una cadena en la que todos los eslabones deben estar en buenas condiciones. Si tan solo un eslabón está roto, la cadena no va a funcionar. Igualmente, si las medidas de bioseguridad sólo son implementadas en ciertas áreas de la granja avícola y no implementadas en otras no serán efectivas. Un plan de bioseguridad efectivo debe tener las siguientes características (Gernat, 2004):

- a. Definir los objetivos y las responsabilidades
- b. Asignar responsabilidades a individuos
- c. Proveer supervisión a los individuos asignados con esas responsabilidades.
- d. Aislar la granja para prevenir la entrada o salida de una enfermedad infecciosa.

e. Puede ser ajustado a medida que las condiciones locales y amenazas de enfermedades cambian regionalmente.

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

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

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

2. Mantener la limpieza dentro del galpón:

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

3. Evitar transportar la enfermedad a la granja

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

La bioseguridad debe ser vista como una de las áreas más importantes para un buen manejo de la producción. La aplicación de un amplio rango de procedimientos enfocados a prevenir o limitar la exposición del lote a los diversos efectos de los organismos patógenos conforman el fundamento del éxito económico en la producción. Los procedimientos a aplicar requieren de un plan detallado y deben delinarse dentro de un plan veterinario

práctico y responsable. Las aplicaciones de estos procedimientos pueden resultar en un costo-beneficio para alcanzar el objetivo de disminuir el impacto de las enfermedades tanto de importancia veterinaria como en salud humana (Lister, 2008).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo.

La infección causada por SG en las aves produce cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos y el uso de terapia antimicrobiana para su tratamiento favorece el incremento de cepas multirresistentes a distintos antibióticos y de residuos de los mismos en el huevo y órganos de las aves enfermas.

Objetivos.**Objetivo general.**

Generar información referida a la contaminación por *Salmonella* sp. en granjas avícolas con brotes de tifosis aviar y su relación con los parámetros bioquímicos y resistencia a antimicrobianos, como herramientas para el diagnóstico y control de enfermedades bacterianas.

Objetivos específicos.

1. Estudiar la presencia de *Salmonella* sp. en brotes clínicos de tifosis aviar en granjas avícolas y los factores de riesgo implicados.
2. Relacionar los parámetros sanguíneos con el aislamiento de SG en brotes de tifosis aviar en granja avícolas.
3. Estudiar la relación clonal de las cepas de SG junto a cepas de otros serovares aisladas en establecimientos/galpones con brotes de tifosis y proveniente de humanos, y la sensibilidad a antimicrobianos de las mismas, caracterizando fenotípicamente los mecanismos de resistencia en aquellos aislamientos que presenten multirresistencia.
4. Estudiar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano y de residuos de antibióticos, tanto en huevos como en órganos de gallinas ponedoras, que presenten o hayan presentado un brote de tifosis por su riesgo potencial como alérgenos para los consumidores.

Materiales y Métodos

1. Muestreo activo.

1.1. Características de las granjas muestreadas.

Se seleccionaron 20 galpones de aves de postura con antecedentes de brotes de tifosis aviar (TA) desde junio de 2013 a septiembre de 2016. Se consideró como brote epidémico a la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico. La selección de los galpones a muestrear se realizó en base a que los mismos presentaron la enfermedad de TA en forma activa o tenían antecedente de la misma confirmada previamente por el aislamiento de SG en muestras enviadas al Laboratorio de Sanidad Aviar de INTA-EEA Concepción del Uruguay. Por otro lado, el tipo de galpón fue independiente para la toma de muestra, de manera que se tomaron galpones automáticos/jaula, galpones convencionales/jaula, galpones convencionales/piso y galpones/piso con salida al exterior (aves de traspatio). En este último tipo de galpones las aves salían hacia el exterior a pastorear. Se consideró galpón automático/jaula a aquel que contaba con aves en jaulas multinivel, cintas transportadoras de guano, tolvas móviles, sistema automático de recolección de los huevos y sistemas de ambiente controlado. Por el contrario, los galpones convencionales/jaula no poseían esta infraestructura y las actividades de recolección de guano y de huevos se realizaban manualmente. Por último, se consideró galpón convencional/piso a aquel que contaba con las aves en un solo nivel (sobre la cama), con libre movimiento, presencia de nidos para alojar los huevos, bebederos y comederos manuales (Anónimo, 2011; Glatz y Pym, 2013).

Del total de 20 galpones, 3 pertenecieron a la provincia de Santa Fe y 17 a la provincia de Entre Ríos. En promedio, los galpones presentaron una mortandad semanal de 8,3 % y un porcentaje de producción de huevos promedio de 50,5 %. Por otro lado, 6 fueron automáticos/jaula, 16 convencionales/jaula, 1 convencionales/piso y 3 galpones/piso con salida al exterior.

Tabla 3. Número total, ubicación y características de los galpones muestreados en las granjas avícolas con antecedentes de brote de tifosis aviar.

N° galpón	Localidad (Departamento, Provincia)	Tipo de Galpón/ crianza
1	Crespo (Paraná, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
2	Monte Vera (Capital, Santa Fe)	Convencional/Jaula
3	Colonia Sesteada (Uruguay, Entre Ríos)	Convencional/Piso
4	Las Piedras (Gualeduaychú, Entre Ríos)	Convencional/ Piso con salida al exterior
5	Aldea San Rafael (Paraná, Entre Ríos)	Automático/Jaula
6	Colonia Los Ceibos (Uruguay, Entre Ríos)	Convencional/Piso con salida al exterior
7	Monte Vera (Capital, Santa Fe)	Convencional/Jaula
8	Recreo (Capital, Santa Fe)	Automático/Jaula
9	Colonia San José (Colón, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
10	Aldea San Juan (Diamante, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
11	Aldea San Juan (Diamante, Entre Ríos)	Automático/Jaula
12	Aldea Santa Rosa (Paraná, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
13	Aldea Egenfeld (Paraná, Entre Ríos)	Automático/Jaula
14	Colonia Perfección (Uruguay, Entre Ríos)	Convencional/Piso con salida al exterior
15	María Luisa (Paraná, Entre Ríos)	Automático/Jaula
16	María Luisa (Paraná, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
17	Aldea San Rafael (Paraná, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
18	Aldea San Rafael (Paraná, Entre Ríos)	Convencional/Jaula
19	Gualeduaychú (Entre Ríos)	Convencional/Jaula
20	Colonia Nueva al Norte (Colón, Entre Ríos)	Automático/Jaula

1.2. Tipos de muestras.

1.2.1. Alimento: Para los galpones convencionales/jaula se extrajeron muestras de alimento de cada una de las tolvas internas que presentaba el galpón. Si el galpón no

contaba con las mismas, el alimento se tomó desde los comederos (1 muestra por cada fila de jaulas) y/o del silo exterior (1 muestra). Por otro lado, en los galpones convencionales/piso se tomaron muestras de alimento desde los comederos o de la bolsa de alimento (como máximo 2 muestras/galpón). En el caso de los galpones automáticos/jaula, las muestras se tomaron desde los comederos (1 muestra por cada fila de jaulas). En todos los casos, se recolectaron 3 ± 1 kg de alimento/muestra en bolsas plásticas. Para ello se utilizó una pala o cuchara de plástico, previamente desinfectada con etanol al 70 %.

1.2.2. Huevos: De cada galpón se recolectó un maple de treinta huevos, solicitando al propietario de la granja o encargado los huevos más sucios. En el caso de las granjas que no llegaban a completar el maple entero, se solicitó al dueño la recolección del total de huevos que hubiera en el establecimiento. Tres galpones tenían aves que no estaban en edad de postura, por lo que allí no se tomaron huevos.

1.2.3. Guano/calza/nido: En los galpones convencionales/jaula el guano se recolectó con cucharas plásticas estériles de unos 20 a 30 puntos diferentes debajo del foso de las jaulas, por pasillo del galpón. En las granjas con galpones automáticos/jaula se tomaron 2 muestras de guano desde las cintas transportadoras, correspondientes a cada una de las filas de jaulas, previo funcionamiento del sistema de movimiento automático de la cinta. La muestra por hilera/pasillo tuvo un peso promedio de 300 ± 50 g. En el caso de galpones convencionales a piso se tomaron muestras de hisopado de cama con calzas. Para ello se utilizaron cofias estériles las cuales se embebieron con solución fisiológica estéril (0,85 % p/v), posteriormente se colocaron sobre las botas de goma envueltas en bolsas plásticas, previamente desinfectadas con etanol al 70 % y se recorrió hasta la mitad del perímetro utilizando un par de cofias. Para recorrer la mitad restante, se utilizó un nuevo par de cofias. Ambos pares se introdujeron juntos en una bolsa plástica estéril (1 muestra de calza/galpón convencional a piso). Por otro lado, en los galpones convencionales a piso se tomaron dos *pooles* de muestra de nido de al menos 25 g presente en el galpón. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en una conservadora con refrigerantes congelados.

1.2.4. Agua: En cada galpón se recolectó 1 litro de agua del tanque principal externo y/u otro litro de agua tomado desde las canillas ubicadas dentro del galpón (agua exterior e interior, respectivamente). 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 etílico 96 %. Luego se dejó correr el agua durante 3 a 5 minutos antes de proceder a recolectar la muestra en un frasco estéril.

1.2.5. Aves agónicas sacrificadas: Se seleccionaron hasta 10 aves agónicas por galpón mediante observación de las mismas en el día del muestreo. Se eligieron aquellas que presentaban: cresta retraída, guano color verde en la cloaca y con menor consistencia, y de menor tamaño con respecto a sus pares en la jaula. Luego de recolectar las muestras de sangre e hisopados cloacales, como se detalla a continuación, las aves fueron sacrificadas por el veterinario responsable de los galpones muestreados mediante dislocación cervical. Dicho sacrificio se realizó de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Agrícolas en Investigación y Enseñanza (National Research Council, 2010) y de acuerdo con las leyes vigentes de Argentina. En aquellos galpones en los que no se pudieron sacrificar las 10 aves seleccionadas, se sacrificaron sólo el número de aves que el dueño del galpón muestreado autorizaba al veterinario responsable de los galpones. De las 195 aves seleccionadas 109 aves se pudieron sacrificar mediante dislocación cervical. Los animales muertos (naturalmente y sacrificados) fueron transportados al laboratorio con refrigeración.

1.2.5.1. Muestras de sangre: Se tomaron 195 muestras de sangre de aves agónicas pertenecientes a galpones de aves de postura con antecedentes de TA. La sangre se recolectó asépticamente con jeringa de 5 ml y aguja a partir de la vena alar (Figura 13). Una gota de la sangre entera se utilizó para realizar el extendido sanguíneo sobre un portaobjeto, el cual se secó al aire. El resto de la sangre fue colocada en microtubos rotulados, mantenidos a temperatura ambiente. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Sanidad Aviar de la EEA-Concepción del Uruguay, Entre Ríos. En el mismo se separó el coágulo del suero. Este último se conservó a 4 °C. Las muestras de sueros se dividieron para la prueba de aglutinación rápida en placa (ARP) y para la determinación de los diferentes parámetros bioquímicos.

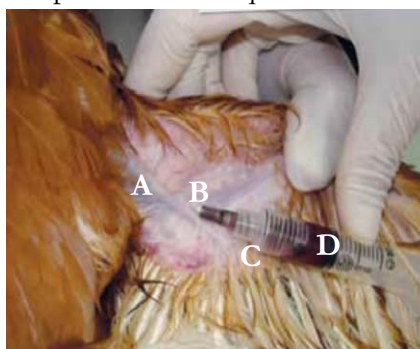


Figura 13. Toma de muestra de sangre. A: vena alar; B: aguja; C: jeringa; D: sangre.

1.2.5.2. Hisopados cloacales: Se hisoparon 195 aves agónicas. Se tomaron dos hisopados por ave. Ambos hisopos estériles fueron humedecidos con solución fisiológica (0,85 % p/v). Una vez extraída el ave de la jaula, se abrió el plumaje de la zona cloacal y se introdujo un hisopo por vez en la cloaca, rotándolo suavemente dos o tres veces hasta obtener una muestra abundante de materia fecal. Posteriormente, el primer hisopado se envasó en tubos de vidrio estériles de forma individual y se transportaron refrigerados hasta el laboratorio para el aislamiento de *Salmonella* sp. Con el segundo hisopado se realizó el extendido de materia fecal en un portaobjeto, los cuales se dejaron secar al aire y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente para la observación de leucocitos.

1.2.5.3. Órganos: Se realizó la necropsia de las aves agónicas sacrificadas para obtener muestras de hígado, bazo, folículos, ciego y patas. Cada uno de los tipos de muestras se coloraron individualmente en bolsas estériles de plástico. En el caso de hígado y bazo se tomaron los órganos enteros. Con respecto a los folículos, se tomaron 3 folículos de igual o diferente tamaño enteros y para la muestra de ciego se tomó una porción del mismo. Para las muestras de patas, se tomó una pata/ave sacrificada.

1.2.6. Aves muertas naturalmente: Se recolectaron hasta 10 aves muertas en cada galpón durante el día de muestreo. En aquellos galpones que no se pudieron recolectar las 10 aves muertas, se tomaron las que había presentes en el mismo. Las aves se colocaron en bolsas plásticas para ser transportadas hasta el laboratorio. Posteriormente en el laboratorio se realizó la necropsia y se tomaron las muestras de órganos descriptas en el punto 1.2.5.3.

1.3. Aislamiento de *Salmonella* sp. en muestras provenientes del monitoreo activo.

1.3.1. Alimento: De cada bolsa de 3 kg se tomaron 2 sub-muestras de 25 g cada una. Las muestras fueron procesadas según lo propuesto por Soria y col., (2011). Se realizó el pre-enriquecimiento en 225 ml de caldo Salmocyst (CSyst; Merck, Darmstadt, Alemania). La mezcla se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Luego, 10 ml de la mezcla se transfirieron a un tubo estéril y se agregó el suplemento selectivo en tableta del medio Salmocyst (1 tableta por tubo, Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubaron a 36 ± 1 °C durante 18-24 h. Posteriormente, se realizó la siembra por agotamiento en estría en los medios agarizados selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato (Oxoid, Basingtoke, Hampshire, England) con el agregado de tergitol 4 (XLDT; 4,6 ml/l; Sigma, St. Louis, MO), y EF-18 (Acumedia).

1.3.2. Huevos: Del maple de 30 huevos se separaron los huevos en 5 grupos de 6 huevos cada uno. En aquellos galpones que no poseían el maple de 30 huevos, se realizó el/los *pooles* con la cantidad de huevos recolectados. En primer lugar, se quebraron los huevos y el contenido del mismo (Cl y/o Y) se colocó en bolsas plásticas en forma individual. Las cáscaras de los 6 huevos que conformaban un *pool* se colocaron en bolsas de plástico estériles y posteriormente se pesaron 25 g para obtener las muestras de C. Por otro lado, con respecto a las muestras individuales de CL y/o Y, se homogeneizaron (Stomacher 440 circulator, Seward, Inglaterra) durante 2,5 min a 2.500 rpm. Posteriormente, el *pool* de 6 CL y/o 6 Y se realizó tomando 4,2 ml de cada una de las muestras individuales de CL y/o Y de manera de obtener la muestra de 25 ml por separado en bolsas de plástico estériles. Las muestras de huevo (C, CL y Y) fueron procesadas según lo propuesto por Soria y col., (2012), utilizando 25 g de C o 25 ml de contenido (Cl ó Y) en 225 ml de caldo triptéina de soja (CTS; Merck, Darmstadt, Germany) adicionado con 35 µg/ml de sulfato de hierro II (Anedra, Argentina, CTS-Fe) como pre-enriquecimiento, incubándolo durante 18-24 h a 35 ± 2 °C. A su término, 1 ml del caldo fue transferido a 10 ml de caldo tetrionato (TT, Acumedia, Lansing, Michigan) adicionado con 20 ml/l de solución de iodo-ioduro de potasio (Anedra, Argentina), 40 mg/ml de novobiocina (N, Sigma, Steinheim, Alemania) y de solución de verde brillante al 0,1 % (p/v) (Sigma, Steinheim, Alemania) e incubados a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Luego de la incubación, del caldo se tomó una ansada del mismo y se sembró en los medios agarizados selectivos-diferenciales Hektoen (Acumedia, Lansing, Michigan) y XLD (Oxoid, Basingtoke, Hampshire, England).

1.3.3. Guano/calza/nido: De cada bolsa de guano con 300 ± 50 g se tomaron 2 submuestras de 25 g. En el caso de los *pooles* de nidos se tomó una submuestra de 25 g. En el caso de las muestras de hisopados de cama (4 calzas) se consideró que pesaban 25 g cada una. Tanto las muestras de nido y de cama (calza) se procesaron como una única muestra. Todas las muestras fueron procesadas según lo propuesto por Soria y col., (2012a). Las muestras fueron pre-enriquecidas en 225 ml de agua de peptona tamponada (APT; Merck, Darmstadt, Germany). Las mezclas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. A su término, se inocularon 30 µl del cultivo APT en tres puntos equidistantes en medio modificado semisólido Rappaport Vassiliadis (MSRV, Acumedia) suplementado con 1 ml/l de una solución de novobiocina al 2 %. Las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1$ °C durante 18-24 h. Posteriormente, se realizó la siembra por agotamiento en estría en los medios agarizados selectivos- diferenciales XLDT y EF-18.

1.3.4. Agua: De cada litro de agua proveniente del exterior y/o del interior de los galpones, se tomaron 2 submuestras de 50 ml de agua cada una. Las muestras fueron procesadas según lo propuesto por Soria y col., (2013b), es decir pre-enriquecidas en 450 ml de agua de peptona tamponada, doble concentración (APT-dc; Merck). La mezcla se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. A su término, se inocularon 30 μ l del cultivo APT-dc en medio MSRV (Acumedia) suplementado con solución de novobiocina al 2 %, al igual que se explicó anteriormente. Las placas fueron incubadas a $41,5 \pm 1$ °C durante 18-24 h. Posteriormente, se realizó la siembra por agotamiento en estría en los medios agarizados selectivos-diferenciales XLDT y EF-18.

1.3.5. Hisopados cloacales: Los hisopados cloacales de las aves sacrificadas se procesaron de forma individual. Cada uno de los tubos estériles con las muestras de hisopados cloacales fueron pre-enriquecidas con 5 ml de APT (Merck) y se los procesó según lo descrito para las muestras de guano/calza/nido en el punto 1.3.3.

1.3.6. Órganos de aves: Por su parte, todas las muestras de órganos fueron procesadas en forma individual y en conjunto. La muestra de hisopado de médula ósea del hueso tarso-metatarso fue tomada con hisopo humedecido en solución fisiológica estéril (0,85 %). En primer lugar, la cara interna de una porción de los órganos de hígado y bazo, las muestras de hisopos embebidos con el contenido de folículos, ciego y los hisopados de médula ósea fueron sembrados, individualmente mediante siembra directa, en agar MC (Acumedia) y agar *Salmonella-Shigella* (SS, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) e incubados a 37 °C por 18-24 h. Al término de este tiempo, en las placas que no se observó crecimiento se incubaron a la misma temperatura por 18-24 h más. A su vez, se juntaron porciones de los hígados y bazo (*pool* HB), contenido de ciegos (*pool* Cie) y contenido de folículos (*pool* Fol) de las aves de cada galpón. En el caso de aquellos galpones en donde había una sola ave muerta, se sembró *pool* de órganos, el cual incluía: hígado, bazo, folículos y ciegos (*pool* Org). Todos los *pools* se diluyeron en caldo tetracionato con solución de iodo-ioduro de potasio, verde brillante y novobiocina en relación 1/10. La mezcla se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-24 h. Luego las muestras fueron sembradas por agotamiento en estrías en placas de agar SS (Merck) y MC (Acumedia).

En todos los casos, se tomaron de cada placa de agar selectivo-diferencial una o dos colonias compatibles fenotípicamente con *Salmonella* sp. En caso de no haber colonias bacterianas compatibles con *Salmonella* sp., se tomaron igualmente dos colonias al azar. A partir de los cultivos bacterianos puros 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 eran cepas lisas o rugosas, utilizando un control de la solución de acriflavina y un control de la bacteria diluida en solución salina al 0,85 %. Todos los aislamientos fueron conservados en agar nutritivo hasta su serotipificación (en caso de *Salmonellas* tipo móvil). Una granja fue considerada positiva a *Salmonella* sp. cuando esta bacteria se aisló en al menos una de las muestras procesadas. Se seleccionaron para este trabajo de tesis al menos 10 aislamientos de SG/establecimiento.

1.3.7. Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Salmonella* sp.

1.3.7.1. Serotipificación: La serotipificación de los aislamientos de *Salmonella* tipo móviles incluidos en este trabajo de tesis se realizó según el esquema de Kauffman-White-Le Minor en el laboratorio de Producción de antígenos y antisueros del Instituto Carlos G. Malbrán. En primer lugar, los aislamientos en agar nutritivo fueron cultivados en placas de agar tripteína de soja (ATS, Acumedia, Lansing, Michigan) y se incubaron a 35 ± 2 °C, durante 18-24 h, para ser utilizados en la caracterización del antígeno somático (Ag O, realizado sobre una placa de vidrio) y del antígeno flagelar (Ag H, realizada en tubo).

1.3.7.1.1. Serotipificación somática. A partir del cultivo en ATS se verificó que el mismo se encontraba en forma lisa, suspendiendo las bacterias en solución salina al 0,85 %. Las cepas sin autoaglutinación (lisas) se colocaron sobre una placa de vidrio junto a 20 µl de los antisueros polivalentes OS-A y OS-B (INPB-A.N.L.I.S., Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina). Luego, se mezcló cuidadosamente con palillo durante 2 min para observar presencia o ausencia de aglutinación bajo luz oblicuamente dirigida. Se continuó la tipificación con los factores somáticos en las cepas que mostraron aglutinación positiva con alguno de los sueros polivalentes.

1.3.7.1.2. Serotipificación flagelar. La serotipificación flagelar se realizó a partir de un cultivo en caldo flagelar (CF: caldo tripteína de soja 15,2 g, tripton 13,3 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml). Desde el cultivo en ATS se sembró en CF e incubó a 37 °C durante 18-24 h. A partir de ese crecimiento, se agregaron 5 ml de solución fisiológica formolada al 1 % (Cloruro de sodio 8,5 g, formalina comercial al 37-40 % 10 ml, agua destilada c.s.p. 1000 ml), y se incubó 1 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). En cuatro tubos de ensayo se colocaron 25 µl de los antisueros flagelares polivalentes HS-A, HS-B, HS-C y HS-1 (INPB-A.N.L.I.S., Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina).

Luego se agregó 1 ml del caldo formolado, incubando durante 1 h a 50 °C en baño de agua. A su término, se observó presencia o ausencia de aglutinación bajo luz oblicua. En los aislamientos que fueron positivos a uno o más sueros polivalentes H (expresión de una o dos fases) se continuó la serotipificación con los factores del antígeno flagelar correspondiente. Las cepas que no aglutinaron a los antisueros polivalentes H, pero fueron positivas a la aglutinación somática, fueron tipificadas como salmonelas inmóviles.

1.3.7.1.3. Inversión de fase. Aquellos aislamientos que mostraron aglutinación positiva a sólo un suero polivalente flagelar (AgH) y por los resultados de la aglutinación frente al AgO se consideraron que se trataba de una serovariedad difásica, fueron evaluados mediante el método de inversión de fase, para evidenciar la fase que no había sido expresada. Para ello, el AgH ya expresado fue enmascarado en tubo de agar movilidad de Craigie el cual tenía una varilla de vidrio hueca. Para la inversión se fundió el agar movilidad y se le agregó el antisuero flagelar correspondiente para inversión que ya había sido expresado por el aislamiento de *Salmonella*, se dejó enfriar y posteriormente se sembró la cepa por dentro de la varilla de vidrio por punción y fue incubado a 37 °C durante 24 h o hasta que se observara crecimiento de la cepa en la parte externa del medio (Figura 14). Posteriormente, se transfirió el crecimiento de la parte externa de la varilla de vidrio a un tubo conteniendo CF para la identificación de la fase flagelar no expresada mediante la técnica explicada en el punto 1.3.7.1.2. De esta manera, las células, que poseían la fase ya identificada, quedaban inmovilizadas por el suero flagelar empleado, mientras que las que tenían la fase no expresada conservaban su movilidad.

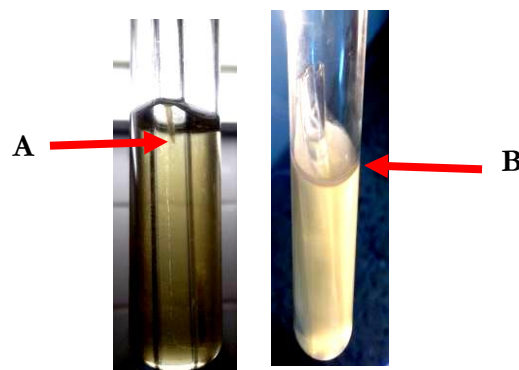


Figura 14. Inversión de fase en agar movilidad de Craigie. A: Siembra de la cepa de *Salmonella* sp. B: Crecimiento de la cepa de *Salmonella* sp. por fuera de la varilla de vidrio hueco.

1.3.8. Confirmación genotípica de los aislamientos de *Salmonella* sp.

1.3.8.1. Extracción de ADN. Todas las extracciones de ADN se obtuvieron a partir de los aislamientos positivos a *Salmonella* sp. Se seleccionaron como máximo un total de 10 aislamientos de SG/establecimiento. En el caso de los aislamientos

de *Salmonella* sp. tipo móviles, se realizó la extracción a todos los aislamientos obtenidos. El ADN fue liberado de las células bacterianas por calentamiento en H₂O destilada estéril durante 10 min a 100 °C en baño seco (Labnet D1 100, Labnet International Inc., Edison, Estados Unidos) y luego centrifugado a 9.300 x g durante 1 min a 4 °C. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y conservado a -70 °C hasta su uso.

1.3.8.2. PCR para *Salmonella* sp.: Las extracciones de ADN correspondientes a los aislamientos fueron utilizadas como templados para la amplificación del gen *invA*. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina). Este gen permitió la detección de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Malorny y col., 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 cebador 0,1 mM (Operon Biotechnologies GmbH, Alemania), 2,5 µl de tampón 10 X (Inbio Higway, Argentina), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (Inbio Higway, Argentina), 0,5 µl de mezcla de los dNTP 0,2 mM cada uno (Inbio Higway, Argentina), 0,2 µl de TaqADN polimerasa 5 U/µl (Inbio Higway, Argentina) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los cebadores empleados para este propósito fueron P139 (GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA) y P141 (TCATCGCACCGTCAAAGGAACC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron como control negativo cepas de *Citrobacter* sp. Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min; 38 ciclos de amplificación a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 64 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 30 s; extensión final a 72 °C en 3 min.

1.3.8.3. PCR múltiple para la detección de *S. ser. Gallinarum* biovares *Gallinarum* y *Pullorum*: Las extracciones de las cepas serotipificadas como inmóviles fueron utilizadas para realizar la amplificación de las regiones polimórficas de los genes *glgC* (cebadores SG-L GATCTGCTGCCAGCTCAA y SG-R GCGCCCTTTTCAAACATA) y *speC* (cebadores *speC* 1 CGGTGTACTGCCCGCTAT y *speC* 2 CTGGGCATTGACGCAA). Esta reacción múltiple produce un amplicón de 174 pb específico para el gen *speC* presente en ambos biovares (SG y SP) y un amplicón de 252 pb específicos para el gen *glgC*, presente en SG. Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de 25 µl que contenían 1,5 µl de cada uno de los cebadores SG-L (10 µM) y SG-R (10 µM), 1 µl de cada uno de los cebadores *speC* 1 (10 µM) y *speC* 2 (10 µM), 2,5 µl de tampón 10 X (Inbio Higway, Argentina), 1,5 µl de MgCl₂

25 mM, 0,5 µl de mezcla de los dNTP 0,2 mM cada uno (Inbio Higway, Argentina) y 0,2 µl de TaqADN polimerasa 5 U/µl (Inbio Higway, Argentina) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Se incluyeron controles positivos (SG y SP) y negativo (*E. coli* ATCC 25922). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 65 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 30 s; extensión final a 72 °C durante 7 min (Kang y col., 2011).

1.3.8.4. PCR para *Salmonella* ser. Enteritidis (SE): Las extracciones de ADN correspondientes a los aislamientos fueron utilizadas como templados para la amplificación de fragmentos diferenciales de ADN (*Sdf*, *Salmonella* *diferent fragment*, por sus siglas en inglés), exclusivos de SE, según Agron y col. (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 10 X (Inbio Higway, Argentina), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (Inbio Higway, Argentina), 0,5 µl de mezcla de los dNTP 0,2 mM cada uno (Inbio Higway, Argentina), 0,125 µl de TaqADN polimerasa 5 U/µl (Inbio Higway, Argentina) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los cebadores empleados para este propósito fueron *Sdf* 1 SE 1063 *Forward* (TGTGTTTATCTGATGCAAGAGG) y *Sdf* 1 SE *Reverse* (CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron control positivo (SE ATCC 13076) y negativo (*E. coli* ATCC 25922). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min; 38 ciclos de amplificación a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 64 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 30 s; extensión final a 72 °C durante 3 min.

1.3.8.5. PCR múltiple para la detección de *Salmonella* ser. Typhimurium (ST): Las extracciones de las cepas aisladas de granjas, que dieron negativo a la reacción de PCR para SE, fueron utilizadas para la amplificación de los genes: *rflB* (F: CCAGCACCAGTTCCAAGTGGATAC y R: GGCTTCCGGCTTATTGGTAAGCA); *fljC* (F: ATAGCCATCTTACCAGTCCCC y R: GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC) y *fljB* (F: ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC y R: TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG), cuyos fragmentos tienen un tamaño de 663, 183 y 526 pb, respectivamente. Esta reacción

permitió la identificación de ST, de acuerdo a Lim y col. (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 10 X (Inbio Higway, Argentina), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (Inbio Higway, Argentina), 0,5 µl de mezcla de los dNTP 0,2 mM cada uno (Inbio Higway, Argentina), 0,125 µl de TaqADN polimerasa 5 U/µl (Inbio Higway, Argentina) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Se incluyeron control positivo (ST 06/11) y negativo (*E. coli* ATCC 25922). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min; 30 ciclos de amplificación a 95 °C durante 1 min., alineamiento a 65 °C durante 1 min., extensión a 72 °C durante 30 s; extensión final a 72 °C durante 1 min.

1.3.9. Análisis estadístico: Para comparar los resultados de los aislamientos de *Salmonella* sp. en las diferentes muestras analizadas se usó la prueba de hipótesis para diferencia de proporciones, asumiendo que todos los valores son igualmente probables. Cada valor de exactitud (EXA_r) y sensibilidad (Se_r) relativos 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, contenían los verdaderos valores de EXA y Se. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de $P < 0,05$.

La concordancia entre las diferentes muestras y los medios agarizados selectivos y diferenciales para la detección de *Salmonella* en los diferentes tipos de muestras estudiadas fue evaluada mediante el estadístico Kappa (Martin, 1977) y la prueba de McNemar. El primero fue calculado para evaluar el grado de concordancia para clasificar las muestras como positivas o negativas más allá del azar (Dawson y Trapp, 2004). El nivel de concordancia se determinó comparando el valor obtenido con la escala de valores predeterminados: 0,93 a 1,00 (concordancia excelente); 0,81 a 0,92 (muy buena concordancia); 0,61 a 0,80 (concordancia buena); 0,41 a 0,60 (concordancia débil); 0,21 a 0,40 (concordancia ligera); 0,01 a 0,20 (concordancia pobre) y menor a 0,01 (concordancia nula). La prueba de McNemar se calculó utilizando una aproximación de χ^2 a $P < 0,05$ (GraphPad Software, 2018).

1.4. Relación de pesos de aves muertas naturalmente o sacrificadas/órganos (hígado y bazo): Antes de realizar la necropsia, las aves muertas

naturalmente o sacrificadas fueron pesadas en balanza electrónica, escala 0,1 g (Precisa 3000 D, Zurich, Suiza). Posteriormente, se realizó la necropsia en esterilidad para obtener muestras de diferentes órganos como ser hígado y/o vesícula biliar, bazo, folículos, muestras de contenido de ciegos y pata en bolsas de plástico estériles individuales. El hígado y bazo se pesaron de manera individual en balanza granataria (Precisa 3000 D) para determinar la relación entre el peso del ave/peso de los órganos (hígado y bazo).

1.5. Estudios de parámetros hematológicos, serológicos y presencia de leucocitos fecales en muestras provenientes de aves agónicas.

1.5.1. Recuento diferencial de leucocitos en sangre entera: Los extendidos sanguíneos fueron teñidos con los colorantes May-Grünwald (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y Giemsa (Biopur, Argentina). Se contaron 100 leucocitos en microscopio óptico (Leica, DM 1000, Suiza) con un aumento total 1000 X, diferenciando los granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) de los agranulocitos (linfocitos y monocitos) y se expresaron como número relativo (porcentaje). Además, se calculó la relación heterófilo/linfocito (H/L). El recuento total de glóbulos blancos (RTGB) se estimó según Cotter (2015), realizándose un recuento de todas las clases de leucocitos en cinco campos microscópicos de 400 X y se multiplicó por 4.000 para expresar el RTGB/mm³ (Figura 15).

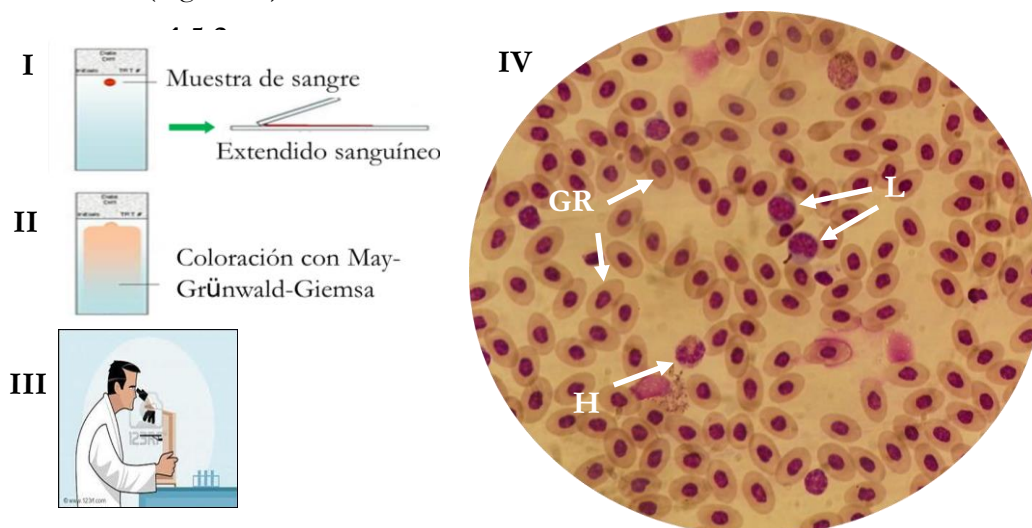


Figura 15. Recuento de leucocitos en sangre entera. I: preparación del extendido; II: coloración; III: observación al microscopio; IV: frotis sanguíneo de aves. GR: glóbulos rojos, H: heterófilos, L: Linfocitos.

1.5.3. Parámetros bioquímicos: Se determinaron diferentes parámetros bioquímicos en el suero de aves agónicas. Proteínas totales (PT) y albúmina (ALB) fueron determinadas mediante método colorimétrico usando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Por otro lado, la concentración de globulina (GLOB) se determinó por diferencia entre PT y ALB. La relación ALB/GLOB fue calculada. Asimismo, se

determinaron las actividades enzimáticas de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) mediante método colorimétrico, según Reitman y Frankel (1957). También se calculó la relación AST/ALT. La actividad enzimática de la gamma glutamil transferasa (GGT) se determinó según Szasz (1969).

1.5.4. Detección de *Salmonella* biovar Gallinarum mediante aglutinación rápida en placa: Los sueros obtenidos a partir de las muestras de sangre fueron inactivados a 56 °C durante 30 min en baño maría. Luego se realizó la técnica de aglutinación rápida en placa (ARP). Se siguió el protocolo descrito para *Mycoplasma* en el Plan Nacional de Sanidad Avícola de Argentina (SENASA, 2003). Por no contar con muestra suficiente, del total de 195 muestras de suero, 178 se utilizaron para la ARP. La ARP fue realizada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), con antígeno de SP (Charles River Lab, Wilmington, MA) teñido con cristal violeta. Para la prueba se colocaron 25 µl de antígeno y 25 µl de suero entero sobre una placa de plástico iluminada desde abajo. El suero entero y el antígeno se mezclaron con palillos de madera y luego se realizaron movimientos rotatorios suaves con la placa. Los resultados para la prueba ARP fueron registrados dentro de los 2 minutos. Los sueros enteros positivos a la aglutinación fueron diluidos en solución fisiológica (relación 1/8) y se realizó la ARP nuevamente. Se consideró positiva la presencia de anticuerpos contra SG cuando la ARP fue positiva en la dilución 1/8. Como controles positivos y negativos se utilizaron sueros positivos a SG y negativos conocidos, respectivamente.

1.5.5. Presencia de leucocitos fecales (LF): Los extendidos fueron coloreados con fucsina (Cicarelli, Argentina) y observados al microscopio óptico con un aumento total de 400 X (Leica, DM 1000) para determinar la presencia o ausencia de leucocitos en materia fecal. Se observaron al menos 30 campos para determinar el número de leucocitos por campo. Se consideró muestra positiva a leucocitos en materia fecal cuando, al menos, se observaban 5 leucocitos por campo (Figura 16).

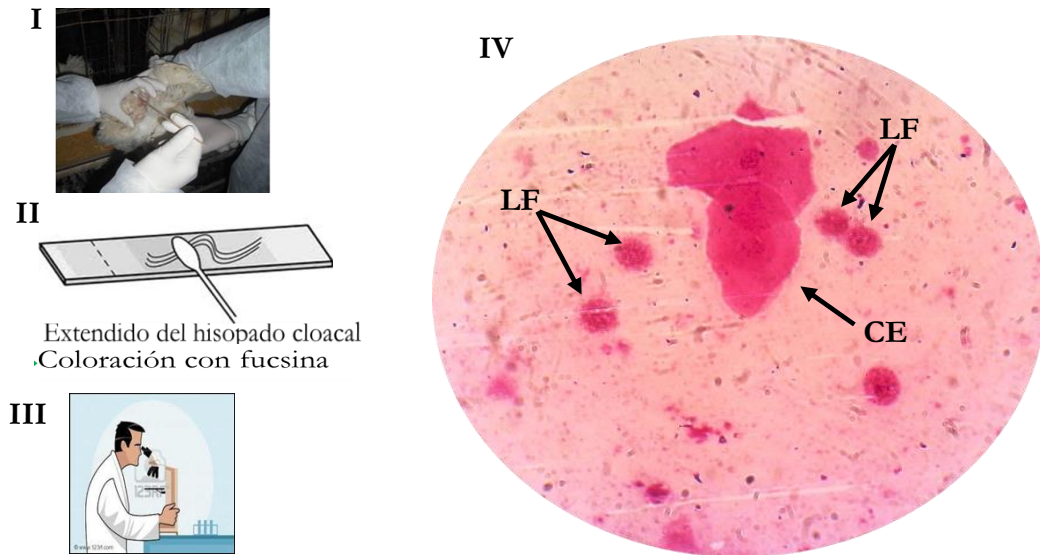


Figura 16. Presencia de leucocitos fecales en hisopados cloacales. I: toma de muestra; II: coloración; III: observación al microscopio; IV: extendido del hisopado cloacal de las aves. LF: leucocitos fecales, CE: células epiteliales.

1.5.6. Análisis estadístico: Cada una de las aves fueron consideradas como una unidad. Los valores hematológicos y bioquímicos fueron expresados como media \pm desvío estándar (DE). Además, fueron considerados los resultados del aislamiento de SG, la ARP y LF en el análisis. Los resultados se informaron como el rango o media \pm DE. Las diferencias en las medias se evaluaron mediante una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los resultados se consideraron estadísticamente diferentes con un valor de $P < 0,05$ (Rossman y Chance, 1998). La variable edad de las aves de postura se dividió en dos categorías: iguales o mayores de 18 meses y menores de 18 meses. La división se basó en el promedio de edad de la primera muda en gallinas ponedoras (Soria y col., 2015). La concordancia entre el aislamiento de SG y los resultados obtenidos en la ARP y la presencia de LF se evaluó mediante el estadístico Kappa (Martín, 1977) y la prueba de McNemar como se explicó en el punto 1.3.9.

1.6. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano presentes en muestras de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.

1.6.1. Tipos de muestras: Las muestras individuales de CL y Y, alimento, guano, agua utilizadas en este punto fueron las que se obtuvieron en el procedimiento para el aislamiento de *Salmonella* sp. en el punto 1.3. Los galpones N° 11 y 12 presentaron 1 y 9 huevos sin yema, respectivamente. Por otro lado, en los galpones 9, 10 y 18 no se obtuvieron muestras de huevos debido a que por la edad de las aves las

mismas no estaban en postura. Para el ensayo las muestras de alimento y guano se diluyeron en solución fisiológica estéril 0,85 % (dilución 1/10) mientras que las muestras de agua se sembraron sin realizar dilución. Por otro lado, Las muestras de órganos utilizadas en este punto fueron las utilizadas para el aislamiento de *Salmonella* sp. en el punto 1.3.6 (aves muertas naturalmente y sacrificadas). Para el ensayo, se sembraron porciones de los órganos de aproximadamente 1 cm.

1.6.2. Cepas utilizadas en el ensayo: Las cepas de *Salmonella* sp. utilizadas para analizar las muestras de huevo, alimento, guano y agua se describen en la Tabla 4. Como control del ensayo se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (SENASA, 2002). En las muestras de órganos sólo se utilizó esta última cepa.

Tabla 4. Cepas de *Salmonella* utilizadas en el estudio de presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano.

Cepa	Origen	Colección de cultivo
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis INTA PT 1	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium INTA 06/11	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum INTA 03/121	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA 90/142	Aves	EEA INTA Balcarce

1.6.3. Ensayo para determinar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano: A partir del cultivo en ATS, todos los microorganismos fueron sembrados e incubados a 37 °C durante 18-24 h en caldo tripteína de soja (Merck, Darmstadt, Germany) hasta alcanzar la turbidez del estándar equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Posteriormente, las placas de agar Müeller-Hinton (Britania, Argentina) fueron sembradas con cada una de las cepas ensayadas con hisopo estéril en todas las direcciones de manera de obtener un crecimiento bacteriano en forma de pátina. Se dejaron secar tapadas aproximadamente de 3 a 5 min a temperatura ambiente, posteriormente las mismas fueron inoculadas de la siguiente manera dependiendo del tipo de muestra ensayada (Figura 17):

- a. **Muestras de huevo:** se sembraron 200 µl de muestra de CL y Y en un pocillo de 10 mm de diámetro realizado con sacabocado en el agar Müeller Hinton (Soria, 2012).

- b. **Muestras de alimento y guano:** se sembraron 25 μl de las muestras diluidas en solución fisiológica.
- c. **Muestras de agua:** se sembraron 25 μl de las muestras de agua sin diluir.
- d. **Muestras de hígado y bazo:** se colocaron porciones de hígado y bazo en las placas de agar Müller-Hinton apoyando la cara interna de estos órganos.

Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18-24 h. La prueba fue considerada positiva a la presencia de sustancias antibacterianas cuando existían halos mayores a 11 mm de diámetro para las muestras de huevo y porciones de órganos (hígado y bazo) y halos mayores a 6 mm de diámetro en las muestras de alimento, guano y agua.

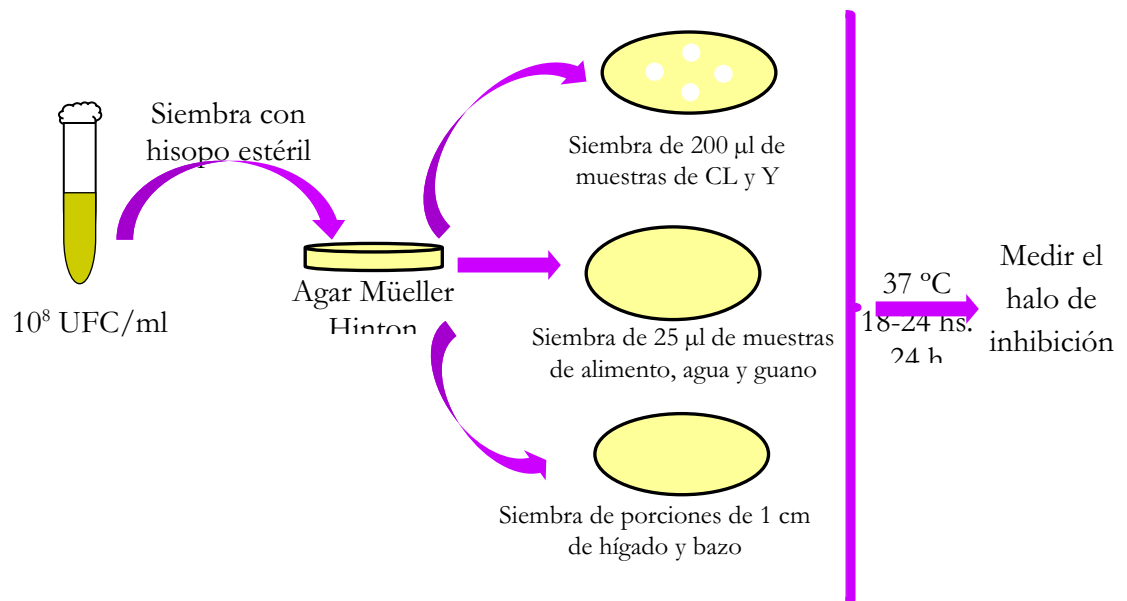


Figura 17. Procedimiento para evaluar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano.

1.6.4. Detección de sustancias inhibidoras presentes en huevo mediante kit comercial: Se evaluaron sólo las muestras de huevo (CL y Y). Se utilizó el Kit Zeu Explorer 2.0 (ZeuLab, Zaragoza, España). Es una prueba basada en la inhibición del crecimiento de la bacteria *Geobacillus stearothermophilus*. El fundamento de la prueba se detalla en el anexo sección I. La lectura de los resultados se realizó de manera visual invirtiendo la placa y observando los pocillos desde el fondo de la misma (Figura 18). Se utilizó como control negativo la muestra suministrada por el fabricante para huevo (ZE/CN2). El límite de detección del kit para las muestras de huevo se detalla en la tabla 5.



Figura 18. Procedimiento para evaluar la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano mediante Kit explorer.

Tabla 5. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb) del kit Explorer para diferentes antimicrobianos en huevos de gallina, según fabricante.

Antibiótico	Kit Explorer ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Eritromicina	400
Tilosina	400
Neomicina	1.600
Sulfadiazina	400
Tetraciclina	2.800
Oxitetraciclina	2.800

1.6.5. Detección de quinolonas presentes en huevo mediante kit

comercial: Las muestras de huevo que dieron positivo en el punto anterior (1.6.4), fueron evaluadas para determinar residuos de quinolonas. Se utilizó el kit comercial Equinox (ZeuLab, Zaragoza, España). Este método cualitativo está basado en la inhibición del crecimiento de *E. coli*, bacteria especialmente sensible a quinolonas. Su fundamento se detalla en el anexo sección II. Si la muestra a evaluar contiene una concentración de quinolonas superior al límite de detección de la prueba, el crecimiento del microorganismo se inhibe y por lo tanto no se produce el cambio de color. La lectura de los resultados se realizó de manera visual (Figura 19).



Figura 19. Procedimiento para evaluar la presencia de quinolonas mediante Kit Equinox.

1.6.6. Análisis estadístico: La concordancia entre las muestras de clara y yema para la detección de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano para cada uno de los serovares de *Salmonella* utilizados en el ensayo y la concordancia entre los métodos utilizados para este ensayo, fueron evaluados mediante el estadístico Kappa (Martin, 1977) y la prueba de McNemar según lo descrito en el punto 3.1.6.

1.7. Evaluación de análisis de riesgo.

1.7.1. Diseño del cuestionario: La encuesta se basó en las medidas de bioseguridad dispuestas para los establecimientos avícolas según la reglamentación de SENASA 542/2010 (SENASA, 2010). Las preguntas fueron cerradas (dicotómicas o de opción múltiple). El cuestionario fue dividido en diferentes secciones:

- ✓ recolección de datos del galpón muestreado (cantidad de aves, edad de las aves, número de aves por jaula, etc.)
- ✓ medidas de bioseguridad en las granjas,
- ✓ sistema de eliminación de cadáveres,
- ✓ características del alimento, abastecimiento de agua, destino de los huevos y guano,
- ✓ medidas tomadas para mantener la sanidad de la granja y
- ✓ datos referidos al personal de las granjas

Las preguntas se realizaron personalmente el día del muestreo, efectuándolas al propietario de la granja, o en su ausencia, al encargado del establecimiento. Para más detalles ver Anexo sección III.

1.7.2. Procesado de los datos y análisis estadístico: Las respuestas obtenidas a partir de la encuesta fueron codificadas en una planilla de Excell (Microsoft). Para cuantificar el riesgo asociado con la presencia de *Salmonella* sp. en las granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de TA, 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*, 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.

Por otro lado, se tomaron datos de encuestas de 20 galpones de aves de postura negativas tanto al aislamiento de SG como a la presencia de anticuerpos para SG, muestreadas previamente por Soria (2013). Las variables tomadas de estos galpones fueron: N° de galpones presentes en la granja, conocimiento de la reglamentación de SENASA 542/2010, cantidad de aves en la granja, edad de las aves, N° de aves/jaula, si recibieron medicación, tipo de galpón, presencia de cerco perimetral, presencia de equipamiento de desinfección, distancia entre las granjas vecinas, equipos para el ingreso de personas, registro foliado de los galpones, presencia de otras especies en el predio, eliminación de cadáveres, control de moscas, control de roedores, origen del alimento, uso de acidificantes, uso de secuestrantes de micotoxinas, presentación del alimento, si realizaba análisis de agua, si reutilizaba el maple, y si vacunaba para SG. Esto permitió determinar el factor de riesgo asociado a la presencia de SG en galpones de aves de postura.

Las variables cuantitativas y las cualitativas con varios niveles fueron categorizadas a dos niveles. Una vez ordenados los datos se procedió al análisis mediante χ^2 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 interacciones. 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.

2. Muestreo pasivo.

2.1. Muestras de aves: Durante el período febrero 2014 a noviembre 2016, se recibieron en el Laboratorio de Sanidad Aviar del INTA-EEA Concepción del Uruguay

muestras provenientes de 49 establecimientos avícolas (245 patas de aves, 20 aves muertas, 59 hígados y 39 bazos) con sospecha de TA. Las mismas provenían de aves (reproductoras, parrilleros y ponedoras) de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Mendoza, Entre Ríos y Buenos Aires. Del total de aislamientos de SG confirmadas como se indica en el punto 1.3, se seleccionaron al menos un aislamiento/establecimiento.

2.2. Confirmación de *Salmonella* sp. provenientes de pacientes humanos:

Durante el mismo período mencionado en el punto 2.1, se recibieron 26 tubos y/o placas con cepas identificadas como *Salmonella* sp. de tipo móvil, provenientes de hospitales públicos y laboratorios privados de la provincia de Entre Ríos aislados del ambiente como de pacientes humanos. Se confirmaron el género *Salmonella* sp. de todas las cepas como se indica en el punto 1.3 y luego las mismas fueron serotipificadas como se indica en el punto 1.3.7.

3. Estudio de la sensibilidad a antibióticos en cepas de *Salmonella* sp.

Se evaluó la sensibilidad a diferentes antimicrobianos (ATM) en las cepas de salmonelas inmóviles (SG) y móviles aisladas y seleccionadas en los puntos 1.3 y 2.1. Por otro lado, se compararon la sensibilidad antimicrobiana de las salmonelas móviles de granja con las salmonelas móviles provenientes de pacientes humanos obtenidas en los puntos 1.3 y 2.2.

3.1. Caracterización fenotípica de la resistencia a diferentes antibióticos.

3.1.1. Antibióticos evaluados: Se utilizó el método de difusión en placa según las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 y 2015). Se evaluaron 29 ATM (OXOID, Inglaterra) pertenecientes a 13 categorías de antibióticos que se utilizan en medicina veterinaria y/o humana (Tabla 6). En el Anexo sección IV se encuentran la lista de ATM evaluados y los puntos de corte utilizados para cada uno.

3.1.2. Prueba de sensibilidad a los antibióticos: Se utilizó el método de difusión en placa según las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 y 2015). Para controlar la precisión y la exactitud de las pruebas de difusión se usó como cepa control del ensayo *Escherichia coli* ATCC 25922. A partir de 2 a 5 colonias bacterianas aisladas se preparó una suspensión en CTS, se incubó a 37 °C de 2 a 4 h hasta alcanzar la turbidez del estándar equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas de agar Müeller-Hinton (Difco, Estados Unidos) fueron sembradas con hisopo estéril en todas las direcciones de manera de obtener un crecimiento

bacteriano en forma de pátina. Se dejaron secar tapadas aproximadamente de 3 a 5 min a temperatura ambiente y luego se colocaron los discos a ensayar con pinza estéril ejerciendo una leve presión en dicho agar. A su término fueron incubadas a 37 °C durante 18-24 h.

Para la lectura de los halos se tuvo en cuenta el área que no mostró desarrollo a simple vista; esto no incluyó velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona de inhibición. El diámetro del halo de inhibición de crecimiento fue medido con una regla (escala 1 mm) y la sensibilidad fue determinada según las recomendaciones del CLSI (2008 y 2015). En base a ello, los microorganismos fueron clasificados como cepas sensibles, cepas con sensibilidad intermedia o cepas resistentes.

3.1.2. Determinación de co-resistencia: La co-resistencia a los antimicrobianos ensayados, pertenecientes a diferentes categorías de ATM, se calculó a través del coeficiente de resistencia múltiple a los antibióticos (RMAs), según la fórmula (Singh y col., 2010):

$$\text{RMAs} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de antibióticos resistentes}}{\text{N}^\circ \text{ total de antibióticos ensayados}}$$

Los aislamientos clasificados como de sensibilidad intermedia, según la zona de inhibición del crecimiento microbiano, fueron considerados como sensibles para el cálculo del coeficiente de RMAs. Por otro lado, para poder clasificar una cepa como cepa multidroga resistente (MDR), extrema droga resistente (XDR) y/o pandroga resistente (PDR) se tuvo en cuenta si una cepa bacteriana tiene resistencia intrínseca a un agente antimicrobiano o a toda la categoría, ya que ese agente o categoría debe eliminarse de la lista antes de aplicar los criterios para las clasificaciones (Magiorakos y col., 2011).

Tabla 6. Antibióticos evaluados frente a diferentes cepas de *Salmonella* sp.

Categoría del antibiótico	Subgrupo	Antibiótico	Concentración (µg/disco)
Penicilinas	Aminopenicilinas	Ampicilina	10
		Amoxicilina	10
Inhibidores de betalactamasas	-	Amoxicilina / Ác. clavulánico	30
Cefalosporinas	1 ^{ra} Generación	Cefalotina	30
	2 ^{da} Generación	Cefoxitina	30
	3 ^{ra} Generación	Cefixima	5
		Cefotaxima	30
		Ceftazidima	30
		Cefpodoxima	10
Carbapenemes	Carbapenemes	Imipenem	10
Quinolonas	1 ^{ra} Generación	Ácido nalidixico	30
	2 ^{da} Generación	Ciprofloxacina	5
		Norfloxacina	10
	3 ^{ra} Generación	Enrofloxacina	5
Tetraciclinas	1 ^{ra} Generación	Tetraciclina	30
	2 ^{da} Generación	Doxiciclina	30
	3 ^{ra} Generación	Tigeciclina	15
Fenicoles	-	Cloranfenicol	30
		Florfenicol	30
Aminoglucósidos	Kanamidas	Amikacina	30
		Kanamicina	30
	Estreptomicinas	Estreptomicina	10
	Gentamicinas	Gentamicina	10
	Neomicinas	Neomicina	30
Antagonistas de la ruta del folato	Combinaciones	Sulfametoxazol/Trimetoprima	23,75/1,25
Lipopéptidos	Polimixinas	Colistina	10
Derivados del Ác. fosfónico	-	Fosfomicina	50
Macrólidos	14 Carbonos	Eritromicina	15
	15 Carbonos	Azitromicina	15

3.1.3. Caracterización fenotípica de la presencia de enzimas Beta lactamasas (BL): Todos aquellos aislamientos de *Salmonella* sp. que mostraron resistencia a cefalosporinas de 3^{ra} generación (C3G), se sometieron a ensayos fenotípicos confirmatorios para detectar la probable producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Para ello se seleccionaron cepas de *Salmonella* sp. que presentaron halos de inhibición para cefpodoxima \leq 17 mm, ceftazidima \leq 22 mm y cefotaxima \leq 27 mm. Posteriormente, se prepararon las cepas y se sembraron como se describió en el

punto 3.1.2. Luego, se colocaron en la placa de Müller-Hinton sembrada los discos de las cefalosporinas de 3° generación solas: Cefotaxima (CTX) y Ceftazidima (CAZ) y los discos de las combinaciones de las cefalosporinas más el ácido clavulánico: cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/ACL) y ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/ACL) y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h (Figura 20). Al término de la incubación, se midieron los halos de inhibición en forma convencional de los 4 discos colocados en la placa. Se confirma la presencia de BLEE cuando el halo de inhibición de la combinación es ≥ 5 mm respecto de la cefalosporina sola (Famiglietti y col., 2005).

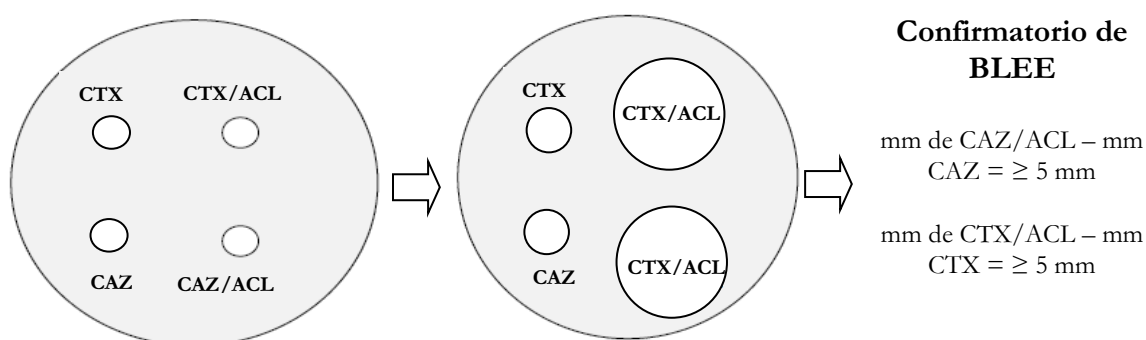


Figura 20: Disposición de discos de antibióticos para la detección fenotípica en productores de BLEE. CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; CLA: Ácido clavulánico.

3.2. Caracterización genotípica de los mecanismos de resistencia de los aislamientos de *Salmonella* sp.

3.2.1. PCR para β -lactamasas tipo bla_{CTX-M2} : El ADN utilizado como templado para la amplificación del gen bla_{CTX-M2} (550 pb) propuesto por Quiroga y col. (2007) se extrajo de las células bacterianas por calentamiento en H₂O destilada estéril durante 10 min a 100 °C en baño seco (Labnet D1 100, Labnet International Inc., Edison, Estados Unidos) y luego centrifugado a 9.300 x g durante 1 min a 4 °C. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y conservado a -70 °C hasta su uso. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina). Los templados de ADN (5 μ l) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 μ l que contenían 1,00 μ l de cada cebador 0,1 mM (Inbio Higway, Argentina), 2,5 μ l de tampón 10 X (Inbio Higway, Argentina), 2,0 μ l de MgCl₂ 25 mM (Inbio Higway, Argentina), 0,25 μ l de mezcla de los dNTP 0,2 mM cada uno (Inbio Higway, Argentina), 0,15 μ l de TaqADN polimerasa 5 U/ μ l (Inbio Higway, Argentina) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los cebadores empleados para este propósito fueron CTX-M2 (F: ATGACTCAGAGCATTCGC y R: TCACTTTATCGGGACCAC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado

por agua bidestilada estéril y como control positivo se incluyó la cepa de *Serratia marcescens* 1115 A, obsequiada por la Dra. Cecilia Rodríguez del laboratorio de biología molecular del Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min; 30 ciclos de amplificación a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 52 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min; extensión final a 72 °C durante 5 min.

3.2.2. PCR para los genes de resistencia a quinolonas y/o fluoroquinolonas: En las cepas que presentaron resistencia a quinolonas y/o fluoroquinolonas se estudió la presencia de los genes *gyrA* y *qnrB*. Las extracciones de ADN correspondientes a los aislamientos fueron utilizadas como templados para la amplificación del gen *gyrA* (589 pb, Andres y col., 2013) y del gen *qnrB* (550 pb, Quiroga y col., 2007). 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 contenían 1,00 µl de cada cebador 0,1 mM (Inbio Higway, Argentina), 2,5 µl de tampón 10 X (Inbio Higway, Argentina), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (Inbio Higway, Argentina), 0,25 µl de mezcla de los dNTP 0,2 mM cada uno (Inbio Higway, Argentina), 0,15 µl de TaqDNA polimerasa 5 U/µl (Inbio Higway, Argentina) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los cebadores empleados para este propósito fueron para el gen *gyrA* (F: CGACCTTGCGAGAGAAAT y R: GTTCCATCAGCCCTTCAA) y para el gen *qnrB* (F: CCGACCTGAGCGGCACTGA y R: CGCTCCATGAGCAACGATGCCT). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron como control positivo para el gen *gyrA* a la cepa SG CUB 226/13 y para el gen *qnrB* el control positivo fue ST 862 A humanos, obsequiada por la Dra. Cecilia Rodríguez del laboratorio de biología molecular del Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de amplificación a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 52 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min; extensión final a 72 °C durante 5 min.

Todos los productos de amplificación fueron sembrados en gel de agarosa para realizar la migración del/los amplicón(es) mediante electroforesis horizontal. Un volumen de 10 µl de amplicón se sembró en un gel de agarosa al 2 % (BioRad, España) en buffer TBE 0,5 X (Tris-Ácido bórico-EDTA) y se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Al finalizar la corrida, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los productos de amplificación fueron visualizados con un transiluminador

UV (UltraBright UV Transiluminator, MBL-21, Maestrogen). El marcador de peso molecular usado contenía bandas de ADN entre 100 y 2080 pb (PB-L Products Biológicos, Buenos Aires, Argentina).

4. Subtipificación molecular de los aislamientos de *Salmonella* sp.

4.1. Extracción de ADN: La extracción de ADN se realizó mediante Kit comercial con columnas, ADN Puriprep-B Kit (InbioHighway, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.2. Reacción de ERIC-PCR en cepas de SG: Se incluyeron aislamientos obtenidos en este trabajo de Tesis y la cepa de SG obtenida de una vacuna comercial de SG 9R (Intervet). Se utilizaron los cebadores ERIC 1 (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) y ERIC 2 (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) (Invitrogen) descritos por Versalovic y col. (1991). La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl donde la mezcla de reacción contenía 2,5 µl de tampón 10 X (InbioHighway, Argentina), 4 µl de mezcla de dNTP 0,2 mM cada uno (InbioHighway), 6 µl de MgCl₂ 25 mM (InbioHighway), 0,25 µl de cada cebador 0,1 mM (Invitrogen), 0,25 µl de AmpliTaq Gold ADN polimerasa 5 U/µl (Applied Biosystems), 2 µl de ADN templado y 9,75 µl de agua tridestilada. La amplificación se realizó en un termociclador BIOER Thermal Cycler (Bioer Technology, Co. Ltd.) con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, 35 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 40 °C durante 3 min, extensión a 72 °C durante 2 min; extensión final a 72 °C durante 7 min. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (Invitrogen Life Technologies, Brasil) y visualizados con bromuro de etidio (2 µg/ml) (Promega). La corrida electroforética fue realizada en buffer TAE 1 X durante 3 h a 80 V y el marcador de peso molecular utilizado fue 1 Kb DNA ladder (Promega).

4.3. Reacción de PFGE en cepas de *Salmonella* sp.: Los criterios de selección de las cepas para este punto fueron:

- aislamientos de SG de acuerdo a la presencia de resistencia a más de 1 ATM
- al menos 1 aislamiento de SG de cada una de las provincias (Mendoza, Jujuy, Buenos Aires, Tucumán y Santa Fe).
- las mismas serovariedades móviles presentes tanto en las granjas como en pacientes humanos.

➤ aislamientos de *Salmonella* tipo móvil de granja más prevalentes en los galpones.

La técnica de PFGE se realizó utilizando el protocolo de la red PulseNet estandarizado para *E. coli* O157:H7, *E. coli* no-O157, *Salmonella* sp., *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* (PulseNet PFGE, 2017). Para ello:

1- Las cepas fueron sembradas inicialmente en agar nutritivo (Britania) en forma de pátina y se incubaron durante 18 h a 37 °C.

2- Las bacterias de la zona de confluencia se recogieron con un hisopo estéril y se re-suspendieron en 2 ml de *buffer* de suspensión celular (BSC, Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8) hasta alcanzar una densidad bacteriana de 0,35-0,4 MFU (*Mc Farland units*) determinado en un densitómetro Mc Farland DEN-1B (Biosan, Biosystems, Argentina).

3- Los tacos de agarosa (*plugs*) fueron preparados a partir de 200 µl de suspensión celular estandarizada mezclados con 20 µl de solución de proteinasa K (20 mg/ml) (PB-L, Buenos Aires, Argentina) y 200 µl de agarosa al 1 % (Bio-Rad, Tecnolab, Argentina) fundida en *buffer* TE 1X (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8.0). Las células dentro de los tacos de agarosa se lisaron con un *buffer* de lisis celular [Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8; + Sarcosina (Sigma, San Luis, Estados Unidos) 1% y proteinasa K (0,1 mg/ml) (PB-L)], incubados a 54 °C, durante 1,5-2 h con agitación (120 rpm). Luego, los tacos se lavaron dos veces con agua de calidad molecular a 50 °C, con agitación, durante 10-15 min y cuatro veces con *buffer* TE 1X estéril. Los tacos de agarosa se almacenaron en *buffer* TE 1X a 4 °C hasta realizar la restricción enzimática.

4- La digestión del ADN en los *plugs* se realizó con la endonucleasa de restricción *Xba*I (30 U) (ThermoScientific, Invitrogen, Argentina) en 200 µl del *buffer* de restricción tango 1X (provisto con la enzima), a 37 °C, durante 1,5 a 2 h.

5- Los tacos se colocaron en un gel de agarosa BioRad 1% en *buffer* TBE 0,5 X [Tris 5,4 g; ácido bórico (Sigma) 2,75 g; 2,0 ml EDTA 0,5 M] en un molde (BioRad, California, Estados Unidos) de 150 ml de 15 calles. La corrida electroforética se realizó en el equipo CHEF DR III (BioRad) utilizando las siguientes condiciones: pulso inicial: 2,2 seg; pulso final: 63,8 seg; voltaje: 6 V/cm; ángulo: 120°; tiempo de corrida: 19-20 h; con temperatura de *buffer* de corrida (TBE 0,5 X) de 14 °C. Se colocó el ADN de una cepa de *Salmonella* ser. Braenderup H9812, digerido con la misma enzima, en dos calles externas y una central en cada gel, para permitir la normalización de las bandas entre los geles.

6- Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0,1 µg/ml durante 20 a 30 min a temperatura ambiente en un agitador orbital (60 rpm), y luego se destiñeron mediante 3 lavados con 400 ml de agua calidad molecular en las mismas condiciones. Para

la documentación de los resultados, los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz UV (Slider Imager, Maestrogen, Nevada, Estados Unidos). Las imágenes fueron registradas utilizando una cámara fotográfica (Canon PowerShot G16, Tokio, Japón) y almacenadas en formato TIFF.

4.4. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de *Salmonella* sp.: La asignación de bandas se determinó manualmente y los patrones de ERIC y PFGE fueron analizados con el programa BioNumerics versión 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando el coeficiente de Dice y mediante UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*, por sus siglas en inglés) para generar un dendograma con 1,5 % y 2,0 % de valor de tolerancia para ERIC y PFGE, respectivamente. De esta manera se generaron patrones únicos o *clusters*, de forma tal que los datos de un mismo *cluster* compartían una serie de características y similitudes, mientras que los datos de *clusters* distintos presentaron mayores diferencias (Jiang y col., 2004).

Resultados

1. Muestreo activo.

1.1. Caracterización de los galpones muestreados.

De los 20 galpones muestreados (Tabla 7), 17 estaban en etapa de postura (13 en granjas comerciales de producción intensiva con crianza en jaula y 4 en granjas con crianza a piso). Sólo 3 galpones tenían aves que no estaban en edad de postura (2 a 4 meses). Sin contar con estos 3 galpones, la edad promedio de las aves fue de 13 meses, con un rango de edad entre 6 a 21 meses como mínimo y máximo, respectivamente. La cantidad de aves de los galpones muestreados estuvo entre 45 y 30.000 aves. El 48,7 % (95/195) y el 51,3 % (100/195) de las aves incluidas en este estudio fueron de plumaje blanco y de color, respectivamente. Por otro lado, sólo los galpones N° 2, 7, 10, 11, 13, 17 y 18 habían recibido la vacuna SG 9R (Tabla 11). Con respecto al uso de antibióticos, 9 galpones indicaron haber utilizado antibióticos: N° 4 (oxitetraciclina), N° 5 (enrofloxacina, kanamicina, gentamicina, tilosina), N° 8 (combinación de fosfomicina + tilosina), N° 9 (kanamicina y gentamicina), N° 12 (oxitetraciclina, fosfomicina, enrofloxacina), N° 13 (florfenicol), N° 14 (enrofloxacina), N° 19 (florfenicol) y N° 20 (amoxicilina y enrofloxacina)

1.2. Aislamiento de *Salmonella* sp.

Considerando un galpón como positivo al aislamiento de *Salmonella* sp. en al menos uno de los tipos de muestras, sobre un total de 20 galpones, 18 resultaron positivos a *Salmonella* sp. (90 %). Sobre el total de muestras analizadas, el 27,3 % de las mismas (473/1.732) fueron positivas al aislamiento de *Salmonella* sp. De ese porcentaje, el 26,4 % (458/1.732) y el 0,9 % (15/1.732) de las muestras fueron positivas a SG y *Salmonella* sp. de tipo móvil, respectivamente. Todas las cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum fueron negativas a la reacción con acriflavina. Dentro de las muestras positivas a *Salmonella* sp., el 4,0 % (19/473) correspondieron a las muestras de alimento, huevo, guano/calza/nido, mientras que el 96 % (454/473) se obtuvieron de las muestras provenientes de aves muertas (naturalmente y sacrificadas).

Tabla 7. Caracterización de los galpones muestreados obtenidos a partir de la encuesta realizada durante el muestreo activo.

Nº galpón	Tipo de Galpón/crianza	Edad promedio (meses)	Nº de aves en el galpón	Vacuna 9 R	Uso de antibióticos
1	Convencional/Jaula	13,2	16.000	No	No
2	Convencional/Jaula	10,5	6.000	Si	No
3	Convencional/Piso	6	70	No	No
4	Convencional/ Piso con salida al exterior	30	45	No	Si
5	Automático/Jaula	13	60.000	No	Si
6	Convencional/Piso con salida al exterior	7,5	450	No	No
7	Convencional/Jaula	13,8	25.000	Si	No
8	Automático/Jaula	6	36.000	No	Si
9	Convencional/Jaula	4	18.000	No	Si
10	Convencional/Jaula	2,3	22.000	Si	No
11	Automático/Jaula	18	30.000	Si	No
12	Convencional/Jaula	20	22.000	No	Si
13	Automático/Jaula	16,3	65.000	Si	Si
14	Convencional/Piso con salida al exterior	11,3	600	No	Si
15	Automático/Jaula	21,8	60.000	No	No
16	Convencional/Jaula	21	20.000	No	No
17	Convencional/Jaula	6,5	18.000	Si	No
18	Convencional/Jaula	3,8	18.000	Si	No
19	Convencional/Jaula	13	520	No	Si
20	Automático/Jaula	8,8	23.500	No	Si

1.2.1. Muestras ambientales.

En la tabla 8 se observan los resultados obtenidos para el aislamiento de *Salmonella* sp. en muestras ambientales (guano, calza, nido, alimento, agua y *pooles* de huevo) provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de TA. Con respecto a los aislamientos de SG, el alimento, *pool* de cáscara y yema presentaron un porcentaje de aislamiento del 2,7 %; 1,4 % y 1,4 %, respectivamente. Las 14 muestras positivas a *Salmonella* sp. tipo móvil fueron de guano (10), calza (1), nido (2) y alimento (1/110, galpón N° 10).

Sólo en el galpón N° 10 se aisló *Salmonella* sp. móvil y SG en muestras de alimento. Las muestras de agua fueron todas negativas al aislamiento de *Salmonella* sp. De los *pooles*

de huevos analizados, separados en grupos de cáscara (C), clara (CL) y yema (Y), sólo en dos galpones se aisló SG, correspondiendo a muestras de Y (galpón N° 4 convencional/piso con salida al exterior) y C (galpón N° 19 convencional/jaula).

Tabla 8. Resultados obtenidos por aislamiento de *Salmonella* sp. en muestras de guano, calza, nido, alimento, agua y *pooles* de huevo provenientes de granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.

N° Galpón	N° de muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp./N° total de muestras procesadas ¹							
	Guano ³	Calza ³	Nido ³	Alimento	Agua	Huevo		
						Cáscara	Clara	Yema
1	0/8	sm	sm	1/8 ²	0/4	0/5	0/5	0/5
2	1/12	sm	sm	0/4	0/4	0/5	0/5	0/5
3	sm	0/1	0/2	0/4	0/4	0/1	0/1	0/1
4	sm	1/1	2/4	0/2	0/2	0/1	0/1	1/1 ²
5	2/4	sm	sm	0/4	0/4	0/5	0/5	0/5
6	sm	0/1	0/2	0/4	0/6	0/2	0/2	0/2
7	2/10	sm	sm	0/6	0/4	0/5	0/5	0/5
8	0/4	sm	sm	0/6	0/2	0/5	0/5	0/5
9	0/12	sm	sm	0/12	0/4	sm	sm	sm
10	2/6	sm	sm	3/12 ^{2,3}	0/4	sm	sm	sm
11	3/4	sm	sm	0/4	0/4	0/5	0/5	0/5
12	0/4	sm	sm	0/8	0/4	0/5	0/5	0/5
13	0/4	sm	sm	0/4	0/4	0/5	0/5	0/5
14	sm	0/1	0/4	0/2	0/2	0/5	0/5	0/5
15	0/4	sm	sm	0/4	0/2	0/5	0/5	0/5
16	0/4	sm	sm	0/8	0/2	0/5	0/5	0/5
17	0/4	sm	sm	0/6	0/4	0/5	0/5	0/5
18	0/6	sm	sm	0/6	0/2	sm	sm	sm
19	0/4	sm	sm	0/2	0/4	1/5 ²	0/5	0/5
20	0/4	sm	sm	0/4	0/2	0/5	0/5	0/5
Total	10/94	1/4	2/12	4/110	0/68	1/74	0/74	1/74

sm= sin muestra. ¹El número total de muestras procesadas incluye las réplicas de cada muestra. ²Aislamiento de *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum. ³Aislamiento de *Salmonella* sp. tipo móvil.

Con respecto a las serovariedades de *Salmonella* de tipo móvil, la tabla 9 muestra la distribución de los diferentes serovares según el tipo de galpón y muestra analizada. Se aislaron un total de 28 cepas correspondientes a 5 galpones muestreados. En los galpones N° 4, 7, 10 y 11 se aisló más de un serovar de *Salmonella*. En el galpón 5, que no había recibido vacuna SG 9R, se aisló sólo SE. Por otro lado, el único galpón positivo en muestra de alimento fue el N° 10, y nido y calza el N°4.

Tabla 9. Serovares de *Salmonella* tipo móvil en muestras de galpones con aves de postura con antecedentes de brotes de tifosis aviar de la provincia de Entre Ríos.

Numero de galpón (Ciudad, tipo de galpón)	Serovares aislados por tipo de muestra (N° de aislamientos)			
	Alimento	Guano	Nido	Calza
4 (Gualeduaychú, Piso)	- -	- -	Cerro (2) -	- Schwarzengrund (3)
5 (Paraná, automático)	-	Enteritidis (4)	-	-
7 (Santa Fe, tradicional)	-	Corvallis (1) Mbandaka (1) Livingstone (2) Cerro (4)	-	-
10 (Diamante, tradicional)	Montevideo (1) - -	- Livingstone (2) Infantis (2)	- - -	- - -
11 (Diamante, automático)	-	Heidelberg (1) Corvallis (2) Derby (3)	-	-

En la tabla 10 se observan los parámetros de Se_r , EXA_r y concordancia para los medios agarizados selectivos-diferenciales empleados para el aislamiento de *Salmonella* para cada tipo de muestra ambiental. En relación a Se_r , su valor estuvo entre 0,50 a 1. En las muestras de alimento, se encontró que los agares XLDT y EF-18 tuvieron Se_r de 0,50, mientras que en las muestras de guano se observó una Se_r entre 0,83 y 0,92 con los mismos medios de cultivos agarizados selectivos-diferenciales. Por otra parte, la EXA_r estuvo entre 0,98 y 0,99 sin diferencias para ninguno de los medios utilizados. La concordancia fue nula para los medios XLDT-EF18 en alimento, mientras que resultó buena para las muestras de guano.

Tabla 10. Sensibilidad (Se_r) y exactitud (EXA_r) relativas y concordancia para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF18, MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS) utilizados en muestras ambientales provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.

Tipo de muestra	Medio selectivo	Se_r	EXA_r	Coefficiente Kappa	P^2
Alimento	XLDT	0,50 ^A (0,15-0,85)	0,98 ^A (0,93-0,99)	0,00	1,000
	EF18	0,50 ^A (0,15-0,85)	0,98 ^A (0,93-0,99)		
Guano	XLDT	0,92 ^A (0,62-1,00)	0,99 ^A (0,93-0,99)	0,79	0,625
	EF18	0,83 ^A (0,54-0,96)	0,98 ^A (0,93-0,99)		

^{A,B} Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente distintos para cada parámetro ($P < 0.05$). ¹El valor de χ^2 se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

1.2.2. Muestras de aves muertas.

1.2.2.1. Aves muertas naturalmente.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras provenientes de las 80 aves muertas naturalmente, se muestran en la tabla 11. Sólo se aisló SG. El porcentaje de aislamiento a este biovar fue de 77,5 % (62/80); 74,7 % (59/79), 71,2 % (57/80) y 63,8 % (51/80) para las muestras de médula ósea, bazo, hígado y folículos, respectivamente. Con respecto a la muestra de ciego, sólo el 22,8 % (18/79) fueron positivas a SG. Por otro lado, la tasa de aislamiento de *Salmonella* sp. presentó diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de contenido de ciego y las muestras de médula ósea, bazo, hígado y folículos ($P < 0,05$). Con respecto a las muestras de *pool*es de órganos, el mayor número de muestras positivas correspondieron al *pool* hígado-bazo, *pool* de folículos y *pool* de órganos con respecto al *pool* de contenido de ciego ($P < 0,05$).

En la tabla 12 se observan los parámetros de Se_r , EXA_r y concordancia para los medios agarizados selectivos-diferenciales para cada tipo de muestra. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las muestras analizadas para los medios MC y SS. La Se_r para MC estuvo entre 0,74 y 1, mientras que para SS estuvo entre 0 y 1. Por otra parte, la EXA_r estuvo entre 0,79 y 1 sin diferencias para ninguno de los medios utilizados. Los agares MC y SS tuvieron una concordancia nula en el *pool* de ciegos, mientras que fue débil en las muestras de *pool* hígado-bazo, ciegos y *pool* folículos. La concordancia fue muy buena para las muestras de bazo y folículos mientras que fue excelente en las muestras de hígado y médula ósea. En ninguna comparación se encontró diferencia significativa.

Tabla 11. Resultados obtenidos por aislamiento de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum en muestras de aves muertas naturalmente provenientes de granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.

N° de galpón	N° de muestras positivas a <i>Salmonella</i> sp./N° total de muestras procesadas								
	Médula ósea	Bazo	Hígado	Folículos	Ciegos	Pooles			
						HB ¹	Folículos	Ciegos	Órganos ²
1	1/1	sm	1/1	1/1	sm	sm	sm	sm	1/1
2	8/10	9/10	9/10	9/10	5/10	1/1	1/1	1/1	sm
3	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	sm	sm	sm	1/1
4	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
5	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	sm	sm	sm	0/1
6	1/3	3/3	3/3	3/3	0/3	1/1	1/1	0/1	sm
7	2/7	2/7	2/7	3/7	2/7	0/1	0/1	0/1	sm
8	7/7	7/7	7/7	7/7	4/7	1/1	1/1	0/1	sm
9	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
10	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5	0/1	0/1	0/1	sm
11	6/8	7/8	7/8	4/8	2/8	1/1	1/1	0/1	sm
12	4/5	3/5	3/5	3/5	0/5	1/1	0/1	0/1	sm
13	9/10	6/10	6/10	5/10	0/10	1/1	1/1	0/1	sm
14	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	1/1	1/1	0/1	sm
15	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	sm
16	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	sm
17	10/10	9/10	8/10	7/10	3/10	0/1	1/1	0/1	sm
18	3/4	2/4	1/4	3/4	0/4	0/1	0/1	0/1	sm
19	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	sm	sm	sm	1/1
20	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
Total de muestras	62/80 ^a	59/79 ^a	57/80 ^a	51/80 ^a	18/79 ^b	7/13 ^a	7/13 ^a	1/13 ^b	3/4
Porcentaje de Tasa de aislamiento o (IC) ²	77,5 ^a (0,671-0,854)	74,7 ^a (0,640-0,830)	71,2 ^a (0,605-0,800)	63,7 ^a (0,528-0,734)	22,8 ^b (0,148-0,332)	53,8 ^a (0,291-0,768)	53,8 ^a (0,291-0,768)	7,7 ^b (0,001-0,354)	75,0 ^a (0,290-0,966)

¹ Pool hígado y bazo. ² Pool de órganos: incluye hígado, bazo, folículo. ²Intervalo de confianza del 95 % (IC)

^{a, b} Valores seguidos por diferentes letras en minúsculas en la misma fila indican diferencia estadística (P < 0,05) para muestras individuales o de *pooles*.

Tabla 12. Sensibilidad (Se_r) y exactitud (EXA_r) relativas y concordancia para los agares selectivos-diferenciales MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS) utilizados en muestras de órganos de aves muertas provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.

Tipo de muestra	Medio selectivo	Se_r	EXA_r	Coefficiente Kappa	P^2
<i>Pool</i> de ciegos	MC	1,00 ^A (0,16-1,00)	1,00 ^A (0,75-1,00)	0,00	-
	SS	0,00 ^A (0,00-0,83)	0,93 ^A (0,66-1,00)		
<i>Pool</i> hígado-bazo	MC	0,86 ^A (0,46-0,99)	0,93 ^A (0,66-1,00)	0,53	1,000
	SS	0,71 ^A (0,35-0,92)	0,86 ^A (0,58-0,97)		
Ciegos	MC	0,74 ^A (0,51-0,89)	0,94 ^A (0,86-0,98)	0,54	1,000
	SS	0,68 ^A (0,46-0,84)	0,92 ^A (0,84-0,97)		
<i>Pool</i> folículos	MC	1,00 ^A (0,63-1,00)	1,00 ^A (0,75-1,00)	0,70	0,500
	SS	0,63 ^A (0,30-0,90)	0,79 ^A (0,52-0,93)		
Bazo	MC	0,98 ^A (0,90-1,00)	0,99 ^A (0,92-1,00)	0,82	0,220
	SS	0,92 ^A (0,81-0,96)	0,94 ^A (0,87-0,98)		
Folículos	MC	0,96 ^A (0,86-0,99)	0,98 ^A (0,91-0,99)	0,84	0,683
	SS	0,92 ^A (0,81-0,99)	0,95 ^A (0,87-0,98)		
Hígado	MC	1,00 ^A (0,92-1,00)	1,00 ^A (0,94-1,00)	0,94	0,480
	SS	0,96 ^A (0,87-0,99)	0,98 ^A (0,91-0,99)		
Médula ósea	MC	0,98 ^A (0,91-1,00)	1,00 ^A (0,93-1,00)	0,96	1,000
	SS	1,00 ^A (0,93-1,00)	1,00 ^A (0,94-1,00)		

^{A,B} Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente distintos para cada parámetro ($P < 0.05$). ¹El valor de χ^2 se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

1.2.2.2. Aves agónicas sacrificadas.

Con respecto a las aves agónicas sacrificadas, de las 785 muestras analizadas (hígado, bazo, folículos, ciegos, médula ósea e hisopados cloacales) obtenidas de los galpones de

aves de postura con antecedentes de TA, el 24,5 % fueron positivas al aislamiento de *Salmonella* sp. (192/785). El 24,3 % de estas muestras fueron positivas a SG (191/785). Con respecto al tipo móvil, sólo una muestra de hisopado cloacal (0,13 %) fue positiva, cuya serovariedad fue *S. ser. Derby*. Del total de 109 aves agónicas sacrificadas y estudiadas, 10 (9,2 %), 16 (14,7 %), 10 (9,2 %), y 5 (4,6 %) fueron positivas a SG en 2, 3, 4 y 5 órganos, respectivamente.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras provenientes de las 109 aves agónicas sacrificadas se muestran en la tabla 13. El porcentaje de aislamiento positivo a SG fue de 36,7 % (40/109), 34,0 % (37/109), 32,1 % (35/109) y 31,2 % (34/109) para las muestras de bazo, hígado, folículos y médula ósea, respectivamente. Con respecto a las muestras de ciego e hisopado cloacal, sólo el 12,8 % (14/109) y el 5,5 % (6/109) fueron positivas a SG, respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de aislamiento entre bazo, hígado, folículos y médula ósea. Por otro lado, se observó diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de ciego e hisopado cloacal con las muestras de bazo, hígado, folículos y médula ósea ($P < 0,05$). La tasa de aislamiento en las muestras de hisopado cloacal en las 195 aves muestreadas fue del 3,6 % (7/195; IC 95 %: 0,016-0,074). Por otro lado, la tasa de aislamiento de *Salmonella* sp. en los *pooles* de órganos estuvo entre 33,3 % y 66,7 %. Se observó diferencias estadísticas entre los *pooles* de hígado-bazo y folículos con el *pool* de ciegos ($P < 0,05$). Del total de muestras de hisopado cloacal analizadas, el galpón N° 11 presentó dos muestras positivas a *Salmonella* sp., una a SG y otra a *S. ser. Derby*.

Tabla 13. Resultados obtenidos para el aislamiento de *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum en muestras de aves agónicas sacrificadas provenientes de galpones de gallinas ponedoras con antecedentes de brote de tifosis aviar.

N° de Galpón	N° de muestras positivas a <i>Salmonella</i> Gallinarum biovar Gallinarum/N° total de muestras procesadas						Pool hígado-bazo	Pool folículos	Pool ciegos
	Bazo	Hígado	Folículos	Médula ósea	Ciegos	Hisopado cloacal			
1	1/10	1/10	1/10	1/10	2/10	2/10	1/1	1/1	1/1
2	4/10	5/10	6/10	1/10	7/10	0/10	1/1	1/1	1/1
3	4/5	3/5	3/5	1/5	0/5	0/5	1/1	1/1	0/1
4	sm	sm ¹	sm	sm	sm	0/10	sm	sm	sm
5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/10	0/1	0/1	0/1
6	sm	sm	sm	sm	sm	0/10	sm	sm	sm
7	sm	sm	sm	sm	sm	1/10	sm	sm	sm
8	sm	sm	sm	sm	sm	0/10	sm	sm	sm
9	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/10	1/1	1/1	0/1
10	6/10	6/10	1/10	8/10	0/10	0/10	0/1	0/1	0/1
11	5/10	3/10	6/10	3/10	1/10	1/10	1/1	1/1	1/1
12	2/10	4/10	1/10	5/10	0/10	0/10	0/1	1/1	0/1
13	sm	sm	sm	sm	sm	0/10	sm	sm	sm
14	5/10	2/10	6/10	2/10	0/10	0/10	1/1	1/1	1/1
15	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/10	0/1	0/1	0/1
16	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/10	0/1	0/1	0/1
17	3/5	3/5	3/5	0/5	0/5	0/10	1/1	1/1	0/1
18	2/5	3/5	1/5	5/5	0/5	0/10	1/1	0/1	0/1
19	2/10	2/10	2/10	2/10	1/10	0/10	1/1	1/1	0/1
20	3/5	2/5	2/5	3/5	0/5	0/10	1/1	1/1	1/1
Total de muestras	40/109	37/109	35/109	34/109	14/109	6/109	10/15	10/15	5/15
Porcentaje de Tasa de aislamiento (IC) ¹	36,7 ^a (0,282-0,460)	34,0 ^a (0,257-0,432)	32,1 ^a (0,241-0,414)	31,2 ^a (0,233-0,404)	12,8 ^b (0,078-0,204)	5,5 ^b (0,023-0,117)	66,7 ^a (0,415-0,850)	66,7 ^a (0,415-0,850)	33,3 ^b (0,150-0,585)

sm: sin muestra; ¹ Intervalo de confianza del 95 % (IC). ^{a-b}: Valores seguidos por diferentes letras en minúscula en la misma fila indican diferencia estadística ($P < 0,05$) para muestras individuales o de a *pooles*.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de concordancia entre los tipos de muestras tomadas para el aislamiento de SG en aves agónicas sacrificadas de galpones con antecedentes de TA. El coeficiente kappa mostró una concordancia entre pobre y buena, dependiendo de las muestras comparadas. Con respecto al aislamiento de *Salmonella* sp., la concordancia entre hígado-bazo fue buena, mientras que fue débil entre hígado-folículo/médula ósea, bazo-folículo/médula ósea, sin diferencia estadística entre ellos ($P > 0,05$). Por otro lado, en las muestras de hígado-ciego, bazo-ciego, folículo-ciego/médula ósea y ciego-hisopado cloacal tuvieron una ligera concordancia. Por último, la concordancia entre hígado/hisopado cloacal, bazo/hisopado cloacal, folículo/hisopado cloacal,

ciego/médula ósea y médula ósea/hisopado cloacal fue pobre, existiendo diferencia estadística entre ellos ($P < 0,05$).

Tabla 14. Concordancia (coeficiente Kappa y prueba de MacNemar) para el aislamiento de *Salmonella* sp. entre los diferentes tipos de muestras de aves agónicas de galpones con antecedentes de tifosis aviar.

Comparación entre el aislamiento de SG proveniente de diferentes muestras	Coefficiente Kappa	P ²
Hígado/bazo	0,72	0,424
Hígado/ folículo	0,54	0,832
Hígado/ ciego	0,30	0,000
Hígado/médula ósea	0,52	0,678
Hígado/hisopado cloacal	0,05	0,000
Bazo/ folículo	0,59	0,264
Bazo/ ciego	0,21	0,000
Bazo/médula ósea	0,49	0,230
Bazo/hisopado cloacal	0,08	0,000
folículo/ ciego	0,27	0,000
folículo /médula ósea	0,26	1,000
folículo/hisopado cloacal	0,11	0,000
ciego /médula ósea	0,13	0,001
Ciego/hisopado cloacal	0,30	0,039
Médula ósea/hisopado cloacal	0,06	0,000

¹El valor de χ^2 se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas ($P < 0,05$).

En la tabla 15 se observan los parámetros de Se_r , EXA_r y concordancia para los medios agarizados selectivos-diferenciales empleados por cada tipo de muestra. No se observaron diferencias estadísticas para estos parámetros en las comparaciones entre los distintos medios de cultivos selectivos-diferenciales utilizados. La Se_r para MC estuvo entre 0,77 y 1, mientras que para SS estuvo entre 0,46 y 1. La EXA_r para dichos medios fue de 0,96 a 1 y 0,87 a 1, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas entre los medios MC y SS en cuanto a Se_r y EXA_r para los distintos tipos de muestras analizadas. Con respecto a los medios utilizados en las muestras de hisopados cloacales, no se observaron diferencias estadísticas entre los medios utilizados y la Se_r fue de 0,43 y 0,71 y la EXA_r fue de 0,98 y 0,99 para XLDT y EF-18, respectivamente. La concordancia estuvo entre ligera (ciego) y excelente (médula ósea) para la comparación de MC-SS en muestras de órganos. Por otro lado, la concordancia fue ligera entre los medios selectivos-diferenciales utilizados

en las muestras de hisopado cloacal (XLDT y EF-18) y no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

Tabla 15. Sensibilidad (Se_r) y exactitud (EXA_r) relativas y concordancia para los agares selectivos-diferenciales xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLDT), EF18, MacConkey (MC) y *Salmonella-Shigella* (SS) utilizados en las muestras de aves agónicas sacrificadas provenientes de granjas con antecedentes de brotes de tifosis aviar.

Tipo de muestra	Medio selectivo	Se_r	EXA_r	Coefficiente Kappa	P^1
Hisopado cloacal	XLDT	0,43 ^A (0,16-0,75)	0,98 ^A (0,95-0,99)	0,23	0,683
	EF18	0,71 ^A (0,35-0,92)	0,99 ^A (0,96-0,99)		
Hígado	MC	0,89 ^A (0,75-0,96)	0,96 ^A (0,91-0,99)	0,83	1,000
	SS	0,89 ^A (0,75-0,96)	0,96 ^A (0,91-0,99)		
Bazo	MC	0,90 ^A (0,77-0,97)	0,96 ^A (0,91-0,99)	0,82	1,000
	SS	0,88 ^A (0,74-0,95)	0,95 ^A (0,89-0,98)		
Folículos	MC	0,92 ^A (0,77-0,98)	0,97 ^A (0,86-0,96)	0,82	0,724
	SS	0,86 ^A (0,71-0,94)	0,95 ^A (0,89-0,98)		
Ciegos	MC	0,77 ^A (0,49-0,92)	0,97 ^A (0,92-0,99)	0,33	0,343
	SS	0,46 ^A (0,23-0,71)	0,94 ^A (0,87-0,97)		
Médula ósea	MC	0,94 ^A (0,80-0,99)	0,98 ^A (0,93-0,99)	0,96	0,480
	SS	1,00 ^A (0,88-1,00)	1,00 ^A (0,96-1,00)		
Pool hígado-bazo	MC	1,00 ^A (0,68-1,00)	1,00 ^A (0,76-1,00)	1,00	1,000
	SS	1,00 ^A (0,51-1,00)	1,00 ^A (0,76-1,00)		
Pool folículos	MC	1,00 ^A (0,68-1,00)	1,00 ^A (0,76-1,00)	0,73	0,480
	SS	0,80 ^A (0,48-0,95)	0,87 ^A (0,61-0,97)		
Pool de ciegos	MC	1,00 ^A (0,51-1,00)	1,00 ^A (0,76-1,00)	0,84	1,000
	SS	0,80 ^A (0,36-0,99)	0,93 ^A (0,68-1,00)		

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

¹El valor de χ^2 se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

1.3. Confirmación genotípica de los aislamientos de *Salmonella* sp.

En la tabla 16 se observan los resultados de la reacción de PCR para los 189 aislamientos (*Salmonella* tipo móvil e inmóvil) de las muestras tomadas en los galpones visitados. Todos los aislamientos fueron positivos a la amplificación por PCR a nivel de género. Con respecto a las PCR específicas para SG-SP, SE y ST de los 189 aislamientos, 158 fueron positivos a SG (88 y 70 aislamientos de aves muertas naturalmente y

sacrificadas, respectivamente), 4 fueron positivos a SE y los 27 restantes fueron negativos a las PCR ensayadas. Al comparar la serotipificación y las PCR, los 4 aislamientos serotipificados como SE (correspondientes a muestras de guano de un solo galpón), también fueron positivos a la reacción de PCR específica para el mismo serovar. Por otro lado, de los 27 aislamientos restantes de *Salmonella* tipo móvil serotipificados como *S. ser. Livingstone* (4); *S. ser. Mbandaka* (1); *S. ser. Infantis* (2); *S. ser. Montevideo* (1); *S. ser. Derby* (6, de las cuales 3 correspondieron a muestras de guano y 3 a una muestra de hisopado cloacal); *S. ser. Schwarzengrund* (3); *S. ser. Heidelberg* (1); *S. ser. Corvallis* (3) y *S. ser. Cerro* (6), todos resultaron negativos a la PCR para SE y ST.

Tabla 16. Resultados de la PCR y serotipificación para los aislamientos obtenidos del muestreo activo en granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de brotes de tifosis aviar. SE= *S. ser. Enteritidis*, SG= *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum, S.P=*S. ser. Gallinarum* biovar Pullorum. NR= no realizado.

Origen de los aislamientos compatibles con <i>Salmonella</i> sp.	N° aislamientos				
	Positivos a PCR				
	S.G	S.P	S.E	S.T	No SE-ST
Alimento	3	0	-	-	1
Cáscara	1	0	NR	NR	NR
Yema	2	0	NR	NR	NR
Guano	NR	NR	4	0	18
Cama	NR	NR	0	0	3
Nido	NR	NR	0	0	2
Hígado	32	0	NR	NR	NR
Bazo	29	0	NR	NR	NR
Folículos	28	0	NR	NR	NR
Ciegos	10	0	NR	NR	NR
Médula ósea	34	0	NR	NR	NR
Hisopado cloacal	3				3
Pool hígado-bazo	6	0	NR	NR	NR
Pool folículos	7	0	NR	NR	NR
Pool ciegos	3				
Total	158	0	4	0	27

1.4. Relación de pesos de órganos (hígado y bazo)/aves muertas naturalmente o sacrificadas.

El peso relativo del hígado y bazo en las aves muertas naturalmente tuvo un valor promedio de 5,3 y 0,6, y de 4,3 y 0,2 en aves positivas y negativas al aislamiento de SG, respectivamente. Por otro lado, con respecto al peso relativo de los órganos (hígado y bazo) y el aislamiento de SG en aves agónicas sacrificadas, el valor promedio fue de 3,6 y 0,3, y de

2,8 y 0,1 para el hígado y bazo en aves agónicas positivas y negativas al aislamiento de SG, respectivamente. Al analizar estadísticamente dichos pesos en aves muertas naturalmente o sacrificadas, se observaron diferencias significativas entre los pesos relativos de ambos órganos, según fueron positivos o negativos al aislamiento de SG ($P < 0,05$).

1.5. Parámetros hematológicos y bioquímicos de aves agónicas de galpones con antecedentes de TA.

Con respecto a los parámetros hematológicos y bioquímicos, los rangos fueron amplios para cada uno de ellos. Se observa que el promedio de los porcentajes para cada uno de los tipos de leucocitos fue de 39,3 %, 56,4 %, 3,5 %, 0,9 % y 0 % para los heterófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, respectivamente. El promedio de la relación H/L fue de 1,1 y del RTGB fue de 121.236/mm³. Con respecto a los parámetros bioquímicos en suero, el promedio fue de 161,5 UI/L, 15,0 UI/L, 25 UI/L, 6,2 g/dl, 2,3 g/dl, 4,0 g/dl para AST, ALT, GGT, PT, ALB, y GLOB, respectivamente, mientras que para la relación ALB/GLOB y AST/ALT fue de 1,0 y 10,6, respectivamente.

En la Tabla 17 se muestran los parámetros sanguíneos analizados en referencia al aislamiento de SG y la presencia de leucocitos fecales (LF). Se analizaron 109 aves para el aislamiento de SG, donde el 55 % (60 animales) y el 45 % (49 animales) fueron positivos en al menos una muestra y negativos a SG en todas las muestras analizadas, respectivamente.

Tabla 17. Recuento total de glóbulos blancos, porcentaje (%) diferencial de leucocitos y parámetros bioquímicos en suero de aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar según el aislamiento de SG y la presencia de LF. Los valores representan el promedio \pm desvío estándar.

Parámetros analizados	Aislamiento de SG (número de muestras)		LF (número de muestras)	
	Positivo (60)	Negativo (49)	Positivo (26)	Negativo (169)
Heterófilos (%)	44,5 \pm 19,1 ^a	30,20 \pm 16,8 ^b	47,7 \pm 21,8 ^a	38,0 \pm 19,7 ^b
Linfocitos (%)	50,2 \pm 19,8 ^a	66,02 \pm 18,1 ^b	48,7 \pm 22,1	57,6 \pm 20,6
Monocitos (%)	3,7 \pm 1,2 ^a	3,2 \pm 1,1 ^b	3,3 \pm 1,0	3,5 \pm 1,1
Eosinófilos (%)	1,6 \pm 2,0 ^a	0,8 \pm 1,4 ^b	0,4 \pm 1,4	0,9 \pm 1,6
Basófilos (%)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Relación heterófilos/Linfocitos	1,3 \pm 1,3 ^a	0,70 \pm 1,0 ^b	1,5 \pm 1,3	1,0 \pm 1,1
Recuento total de glóbulos blancos (mm ³)	139.585 \pm 52.807 ^a	107.253 \pm 35.876 ^b	79.600 \pm 11.879	122.182 \pm 50.083
Aspartato aminotransferasa (AST, UI/L)	172,0 \pm 184,3	202,9 \pm 160,2	157,4 \pm 187,9	149,2 \pm 128,2
Alanina aminotransferasa (ALT, UI/L)	14,2 \pm 4,0	14,0 \pm 2,1	16,8 \pm 8,3	14,7 \pm 5,2
Relación AST/ALT ¹	12,1 \pm 12,7	15,0 \pm 12,5	10,6 \pm 12,7	10,6 \pm 9,5
Gamma glutamil transferasa (UI/L)	27,5 \pm 36,7	30,5 \pm 29,0	38,3 \pm 36,9 ^a	23,1 \pm 27,5 ^b
Proteínas totales (g/dl)	5,1 \pm 1,7 ^a	6,2 \pm 1,8 ^b	8,3 \pm 3,1 ^a	5,9 \pm 2,2 ^b
Albumina (g/dl)	2,2 \pm 1,1	2,2 \pm 0,8	2,3 \pm 0,7	2,3 \pm 1,0
Globulina (g/dl)	3,0 \pm 1,7 ^a	4,0 \pm 1,8 ^b	6,1 \pm 2,8 ^a	3,6 \pm 2,1 ^b
Relación Albumina/Globulina	1,3 \pm 1,3	0,9 \pm 0,6	0,7 \pm 0,4	1,1 \pm 1,0

¹ Relación aspartato aminotransferasa / alanina aminotransferasa

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

Las aves positivas a SG mostraron un mayor porcentaje para los heterófilos, monocitos, eosinófilos, relación H/L y RTGB, mientras que fue menor para los linfocitos, PT y GLOB (P < 0,05), en comparación con las aves que fueron negativas al aislamiento de SG. Con respecto a los LF, se analizaron un total de 195 extendidos, donde el 13,3 % (26 animales) y el 86,7 % (169 animales) fueron positivos y negativos a la presencia de LF, respectivamente. Por otro lado, se observó que el porcentaje de heterófilos, PT, GLOB y la

actividad enzimática de GGT presentaron valores más altos en las aves con LF positivos con respecto a las aves que fueron negativas ($P < 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los otros parámetros estudiados.

Con respecto a la presencia de anticuerpos contra SG en las muestras de suero de aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de TA, se analizaron 178 sueros de 109 aves agónicas, ya que no se logró obtener suero de la sangre extraída de 17 aves agónicas. El 46,6 % (83/178) de muestras de suero entero fueron positivas a la aglutinación rápida en placa (ARP). De ese porcentaje, el 50,6 % de las muestras (42/83, 23,6 % del total de aves agónicas) fueron positivas a la ARP usando las muestras de suero diluidas. La concordancia entre a la ARP de suero entero y suero diluido fue débil, con diferencia estadística entre ellos ($P < 0,05$). Por otro lado, teniendo en cuenta los animales vacunados con la vacuna de *Salmonella* 9R (68/178 aves agónicas), el 51,5 % (35/68) fueron positivos a la prueba. De este porcentaje, el 42,9 % de las muestras (15/35, 22,1 % del total de aves agónicas vacunadas) fueron positivas a la ARP utilizando el suero diluido.

Con respecto a la presencia de LF, el 13,3 % (26/195) y el 86,7 (169/195) fueron positivos y negativos a la prueba, respectivamente. La concordancia entre las pruebas de ARP de suero entero y diluido y la presencia de LF fue nula y pobre, respectivamente ($P < 0,05$).

Con respecto a la ARP, los datos hematológicos y bioquímicos de suero estudiados se muestran en la Tabla 18. Las aves agónicas mostraron un elevado porcentaje de heterófilos, relación H/L y RTGB mientras que fue menor para el porcentaje de linfocitos en las muestras positivas ($P < 0,05$) comparadas con las muestras negativas a la ARP usando tanto muestras de suero entero como diluido. Sin embargo, el porcentaje de eosinófilos fue más elevado en las muestras positivas que en las negativas en suero puro, mientras que GLOB fue mayor en las muestras positivas que en las negativas ($P < 0,05$) en suero diluido. No se observaron diferencias estadísticas significativas para los otros parámetros estudiados.

Tabla 18. Recuento total de glóbulos blancos (mm³), porcentaje diferencial de leucocitos (%), y parámetros de bioquímica de suero en aves agónicas de acuerdo a la aglutinación rápida en placa (ARP). Valores representan el promedio \pm DE. Suero diluido (1:8) con solución fisiológica.

Parámetros analizados	Prueba de ARP (número de muestras)			
	Suero entero		Suero diluido	
	Positivo (83)	Negativo (95)	Positivo (42)	Negativo (135)
Heterófilos (%)	43,3 \pm 19,5 ^a	34,4 \pm 20,0 ^b	49,7 \pm 19,2 ^a	35,1 \pm 19,4 ^b
Linfocitos (%)	52,0 \pm 20,2 ^a	61,7 \pm 20,6 ^b	45,9 \pm 20,1 ^a	60,7 \pm 20,1 ^b
Monocitos (%)	3,5 \pm 1,1	3,4 \pm 1,0	3,6 \pm 1,2	3,4 \pm 1,0
Eosinófilos (%)	1,1 \pm 1,6 ^a	0,6 \pm 1,5 ^b	0,8 \pm 1,4	0,8 \pm 1,6
Basófilos (%)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Relación heterófilos/Linfocitos	1,3 \pm 1,2 ^a	0,9 \pm 1,1 ^b	1,6 \pm 1,3 ^a	0,9 \pm 1,1 ^b
Recuento total de glóbulos blancos (mm ³)	148.119 \pm 46.656 ^a	112.677 \pm 45.802 ^b	157.280 \pm 53.565 ^a	119.482 \pm 46.732 ^b
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	151,2 \pm 139,5	147,8 \pm 133,7	145,4 \pm 139,7	150,8 \pm 135,9
Alanina aminotransferasa (UI/L)	15,3 \pm 6,0	14,7 \pm 5,6	16,0 \pm 6,9	14,7 \pm 5,4
Relación AST/ALT ¹	10,2 \pm 9,2	10,7 \pm 10,4	10,0 \pm 10,1	10,7 \pm 9,8
Gamma glutamil transferasa (UI/L)	26,9 \pm 33,2	23,0 \pm 24,5	27,3 \pm 31,6	24,2 \pm 28,1
Proteínas totales (g/dl)	5,9 \pm 2,6	6,5 \pm 2,3	6,8 \pm 2,9	6,0 \pm 2,3
Albumina (g/dl)	2,3 \pm 1,1	2,2 \pm 0,8	2,1 \pm 1,0	2,3 \pm 0,9
Globulina (g/dl)	3,6 \pm 2,5	4,2 \pm 2,3	4,6 \pm 2,7 ^a	3,7 \pm 2,3 ^b
Relación albumina/Globulina	1,2 \pm 1,2	0,9 \pm 0,8	0,8 \pm 0,9	1,1 \pm 1,0

^{a,b} Valores con diferentes superíndices en la misma fila para suero entero o diluido representan diferencias significativas ($P < 0,05$).

¹AST/ALT: Relación aspartato aminotransferasa / alanina aminotransferasa.

La concordancia entre el aislamiento de SG y los resultados obtenidos en la ARP y la presencia de LF se muestran en la Tabla 19. La concordancia estuvo entre nula y ligera. La concordancia con el aislamiento de SG fue pobre en el caso del ciego e hisopado cloacal y nula en médula ósea. Por otro lado, la concordancia entre el aislamiento de SG y la presencia de LF fue desde nula (médula ósea) a ligera (contenido de ciego); la mayoría de las muestras mostraron una pobre concordancia.

Tabla 19. Concordancia (coeficiente Kappa y prueba de McNemar) para la aglutinación rápida en placa (ARP), presencia de leucocitos fecales (LF) entre las diferentes muestras tomadas para el aislamiento de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) a partir de aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar.

Muestras	ARP				Leucocitos fecales	
	Suero entero		Suero diluido		Coeficiente Kappa	P ¹
	Coeficiente Kappa	P ¹	Coeficiente Kappa	P ¹		
Hígado	0,23	0,256	0,08	0,002	0,05	0,001
Bazo	0,29	0,743	0,24	0,002	0,02	0,001
Folículo	0,31	0,176	0,08	0,006	0,11	0,001
Ciego	0,10	0,001	0,12	0,678	0,30	0,804
Médula ósea	0,00	0,227	0,00	0,004	0,00	0,034
Hisopado cloacal	0,03	0,001	0,10	0,019	0,04	0,213

¹ El valor de χ^2 se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

1.5.1. Relación entre diferentes variables (aislamiento de *Salmonella* sp., ARP y LF) según la edad de las aves agónicas.

En referencia al resultado de aislamiento de SG (positivo y negativo) y a la edad de las aves agónicas (Tabla 20), se observó que las aves con menos de 18 meses de edad presentaron un mayor porcentaje de heterófilos y un menor porcentaje de linfocitos cuando fueron positivas al aislamiento de SG. Sin embargo, ninguno de los valores bioquímicos en suero tuvo una diferencia significativa ($P > 0,05$). Por otro lado, las aves agónicas que tenían ≥ 18 meses de edad y que fueron positivas al aislamiento SG no tuvieron diferencia significativa en ninguno de los parámetros estudiados. El RTGB (mm^3) en aves agónicas de 4,5 - 18 meses fueron más elevados que en las aves agónicas ≥ 18 meses de edad para el aislamiento positivo y negativo de SG ($P < 0,05$), mientras que AST, relación AST/ALT y GGT fueron mayores en las aves agónicas negativas a SG de 4,5-18 meses de edad que en las negativas a SG en aves ≥ 18 meses ($P < 0,05$).

Tabla 20. Recuento total de glóbulos blancos (mm³), porcentaje diferencial de leucocitos (%) y valores de bioquímica de suero en aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar, según la edad de las aves y el aislamiento de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG). Los valores representan el promedio \pm DE.

Parámetros analizados	Edad de las aves			
	4,5 - <18 meses		\geq 18 meses	
	Positivo a SG	Negativo a SG	Positivo a SG	Negativo a SG
Heterófilos (%)	43,4 \pm 17,1 ^a	27,6 \pm 17,7 ^b	42,7 \pm 20,8	34,3 \pm 15,3
Linfocitos (%)	51,7 \pm 17,4 ^a	68,7 \pm 19,0 ^b	51,9 \pm 21,4	61,5 \pm 16,4
Monocitos (%)	3,4 \pm 1,5	3,0 \pm 1,3	3,9 \pm 0,7	3,5 \pm 0,7
Eosinófilos (%)	1,5 \pm 1,7	0,8 \pm 1,4	1,5 \pm 1,4	0,9 \pm 1,5
Basófilos (%)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Relación Heterófilos/Linfocitos	1,2 \pm 1,2	0,7 \pm 1,3	1,2 \pm 1,1	0,7 \pm 0,6
Recuento total de glóbulos blancos (mm ³)	143.300,0 \pm 46.806,4 ^A	124.628,6 \pm 32.986,6 ^A	82.000,0 \pm 20.224,3 ^B	92.050,0 \pm 31.892,4 ^B
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	245,2 \pm 245,0	249,7 \pm 170,4 ^A	100,4 \pm 56,9	116,1 \pm 98,2 ^B
Alanina aminotransferasa (UI/L)	14,5 \pm 5,6	13,9 \pm 1,5	13,3 \pm 0,4	14,1 \pm 3,0
Relación AST/ALT ¹	16,9 \pm 17,0	18,6 \pm 13,5 ^A	7,6 \pm 4,4	8,4 \pm 7,4 ^B
Gamma glutamil transferasa (UI/L)	41,7 \pm 41,7	40,8 \pm 30,8 ^A	14,3 \pm 15,7	11,3 \pm 11,3 ^B
Proteínas totales (g/dl)	5,3 \pm 2,1	6,4 \pm 2,0	5,5 \pm 1,1	6,1 \pm 1,5
Albumina (g/dl)	2,2 \pm 1,4	2,1 \pm 0,8	2,2 \pm 0,7	2,4 \pm 0,8
Globulina (g/dl)	3,3 \pm 1,9	4,3 \pm 2,0	3,2 \pm 1,2	3,7 \pm 1,0
Relación albumina/globulina	1,2 \pm 1,4	0,8 \pm 0,6	1,0 \pm 0,6	1,0 \pm 0,5

^{a,b} Valores con diferentes superíndices en la misma fila representan diferencias significativas ($P < 0,05$) dentro de la misma edad.

^{A,B} Valores con diferentes superíndices en distintas columnas positivo o negativo a SG representan diferencias significativas ($P < 0,05$) para cada parámetro.

¹AST/ALT: Relación aspartato aminotransferasa/alanina aminotransferasa.

En referencia a los resultados de las muestras de suero entero para la ARP y la edad de las aves agónicas, se muestran en la Tabla 21. Se observó que las aves positivas a la serología presentaron valores más altos en el porcentaje de heterófilos y relación de H/L y valores más bajos en el porcentaje de linfocitos ($P < 0,05$) y PT ($P < 0,05$) con respecto a las aves negativas a la prueba serológica en ambos grupos de edades (4,5 - < 18 meses y \geq 18 meses). Por otro lado, las aves agónicas < 18 meses de edad positivas a la ARP, presentaron un valor mayor de PT comparado con las aves positivas \geq 18 meses ($P < 0,05$).

Por otro lado, para las aves negativas a la ARP, los valores de GGT en las aves < 18 meses fue mayor comparado con las aves \geq 18 meses ($P < 0,05$).

Tabla 21. Recuento total de glóbulos blancos, porcentaje diferencial de leucocitos (%) y valores de bioquímica de suero en aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar de acuerdo a la edad de las aves para la aglutinación rápida en placa (ARP) en suero entero. Los valores representan el promedio \pm DE.

Parámetros analizados	ARP para suero entero			
	4,5 - <18 meses		\geq 18 meses	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Heterófilos (%)	46,2 \pm 19,9 ^a	35,8 \pm 20,6 ^{b A}	42,0 \pm 17,6 ^a	25,9 \pm 13,6 ^{bB}
Linfocitos (%)	49,1 \pm 20,4 ^a	60,4 \pm 20,9 ^b	53,1 \pm 18,7 ^a	70,4 \pm 13,6 ^b
Monocitos (%)	3,5 \pm 1,3	3,3 \pm 1,1	3,8 \pm 0,8	3,4 \pm 0,9
Eosinófilos (%)	1,1 \pm 1,6 ^a	0,4 \pm 1,0 ^b	1,1 \pm 1,7	0,4 \pm 0,9
Basófilos (%)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Relación heterófilos/linfocitos	1,4 \pm 1,3 ^a	0,9 \pm 1,1 ^b	1,1 \pm 0,9 ^a	0,4 \pm 0,4 ^b
Recuento total de glóbulos blancos (mm ³)	142.400,0 \pm 43.221,3	116.453,4 \pm 45.842,4	98.800,0 \pm 10.583,0	92.311,1 \pm 28.204,5
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	185,2 \pm 178,0	171,1 \pm 153,8	108,1 \pm 56,0	99,5 \pm 91,2
Alanina aminotransferasa (UI/L)	16,3 \pm 7,8	15,4 \pm 7,0	13,9 \pm 2,3	13,3 \pm 0,3
Relación ALT/AST ¹	12,2 \pm 11,8	12,3 \pm 12,2	7,9 \pm 4,3	7,5 \pm 6,8
Gamma glutamil transferasa (UI/L)	29,9 \pm 39,3	28,7 \pm 27,1 ^A	33,1 \pm 27,2 ^a	11,6 \pm 18,2 ^{bB}
Proteínas totales (g/dl)	6,8 \pm 3,0 ^A	7,1 \pm 2,6	5,3 \pm 1,6 ^B	5,9 \pm 0,6
Albumina (g/dl)	2,5 \pm 1,2	2,3 \pm 0,9	2,0 \pm 0,8	2,2 \pm 0,5
Globulina (g/dl)	4,4 \pm 2,9	4,8 \pm 2,6	3,3 \pm 1,3	3,7 \pm 0,6
Relación albumina/globulina	1,2 \pm 1,3	0,9 \pm 0,8	0,8 \pm 0,6	0,9 \pm 0,3

^{a,b} Valores con diferentes superíndices en la misma fila para las aves agónicas de la misma edad en suero entero son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

^{A,B} Valores con diferentes superíndices en distintas columnas positivo o negativo a SG son significativamente diferentes ($P < 0,05$) para cada uno de los parámetros en suero entero.

¹Suero diluido (1:8) con solución fisiológica. ²AST/ALT: Relación aspartato aminotransferasa/Alanina aminotransferasa.

Para el suero diluido (Tabla 22) se observó que las aves < 18 meses positivas a la serología presentaron valores más altos en el porcentaje de heterófilos, relación de H/L, RTGB, GLOB y valores más bajos en el porcentaje de linfocitos con respecto a las aves negativas a la prueba serológica ($P < 0,05$). Por otro lado, los valores de GGT fueron más altos en aves positivas a la ARP con suero diluido en aves \geq 18 meses con respecto a las aves negativas a la prueba para el mismo rango de edad ($P < 0,05$). Al comparar las aves positivas en ambas edades se observó que el porcentaje de heterófilos, relación H/L, RTGB, PT, ALB y GLOB fueron mayores mientras que el porcentaje de linfocitos y GGT

fueron menores en aves < 18 meses con respecto a las ≥ 18 meses ($P < 0,05$). En el caso de las aves negativas a la ARP y < 18 meses se observó que el RTGB, AST GGT y GLOB fueron más altos comparados con las aves ≥ 18 meses ($P < 0,05$).

Tabla 22. Recuento total de glóbulos blancos, porcentaje diferencial de leucocitos (%) y valores de bioquímica de suero en aves agónicas provenientes de galpones con antecedentes de tifosis aviar de acuerdo a la edad de las aves para la aglutinación rápida en placa (ARP) con suero diluido. Los valores representan el promedio \pm DE.

Parámetros analizados	ARP para suero diluido ¹			
	4.5 - <18 meses		≥ 18 meses	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Heterófilos (%)	53,3 \pm 19,1 ^{aA}	36,1 \pm 19,9 ^b	38,7 \pm 13,7 ^B	32,2 \pm 18,6
Linfocitos (%)	42,2 \pm 20,1 ^{aA}	59,9 \pm 20,1 ^b	57,4 \pm 14,8 ^B	63,3 \pm 19,5
Monocitos (%)	3,6 \pm 1,4	3,3 \pm 1,1	3,4 \pm 0,9	3,6 \pm 0,9
Eosinófilos (%)	0,8 \pm 1,4	0,6 \pm 1,3	0,5 \pm 1,5	0,8 \pm 1,3
Basófilos (%)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Relación heterófilos/linfocitos	1,8 \pm 1,4 ^{aA}	0,9 \pm 1,1 ^b	0,8 \pm 0,5 ^B	0,8 \pm 0,9
Recuento total de glóbulos blancos (mm ³)	160.800,0 \pm 50.808,5 ^{aA}	121.169,2 \pm 43.498,7 ^{bA}	98.000,0 \pm 5.091,2 ^B	93.040,0 \pm 27.073,5 ^B
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	175,1 \pm 173,3	177,7 \pm 163,3 ^A	137,8 \pm 144,4	106,3 \pm 86,3 ^B
Alanina aminotransferasa (UI/L)	17,2 \pm 8,7	15,4 \pm 6,8	13,5 \pm 0,4	13,7 \pm 2,0
Relación ALT/AST ¹	10,2 \pm 19,9	12,4 \pm 11,9	10,4 \pm 11,2	7,9 \pm 6,5
Gamma glutamil transferasa (UI/L)	20,9 \pm 32,0 ^A	32,4 \pm 32,6 ^A	53,6 \pm 40,6 ^{aB}	13,3 \pm 17,4 ^{bB}
Proteínas totales (g/dl)	7,9 \pm 3,1 ^A	6,7 \pm 2,6	5,2 \pm 1,7 ^B	5,7 \pm 1,1
Albumina (g/dl)	2,4 \pm 1,1 ^A	2,3 \pm 1,0	1,7 \pm 0,5 ^{aB}	2,3 \pm 0,7 ^b
Globulina (g/dl)	5,7 \pm 2,9 ^{aA}	4,4 \pm 2,5 ^{bA}	3,5 \pm 1,3 ^B	3,4 \pm 0,9 ^B
Relación albumina/globulina	0,8 \pm 0,9	1,0 \pm 1,1	0,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,5

^{a,b} Valores con diferentes superíndices en la misma fila para las aves agónicas de la misma edad en suero diluido son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

^{A,B} Valores con diferentes superíndices en distintas columnas positivo o negativo a SG son significativamente diferentes ($P < 0,05$) para cada uno de los parámetros en suero diluido.

¹Suero diluido (1:8) con solución fisiológica. ²AST/ALT: Relación aspartato aminotransferasa/Alanina aminotransferasa.

1.6. Evaluación de sustancias inhibidoras del crecimiento de *Salmonella* sp. presentes en diferentes muestras de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.

1.6.1. Número y tipo de muestra.

Los tipos y números de muestras se detallan en la tabla 23. Se analizó un total de 1.374. Del total de muestras, 864 correspondieron a muestras de huevo (CL y Y), 50 de alimento, 50 de guano, 32 de agua, 218 y 160 correspondieron a muestras de órganos (Hígado y bazo) provenientes de aves agónicas sacrificadas y muertas naturalmente, respectivamente.

Tabla 23. Número y tipo de muestras utilizadas en el ensayo de presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano tomadas en galpones de granjas avícolas con antecedentes de brote de tifosis aviar.

N° galpón	Huevos		Alimento	Guano	Agua	Órganos			
	Clara	Yema				Aves agónicas		Aves muertas	
						Hígado	Bazo	Hígado	Bazo
1	30	30	4	4	2	10	10	1	1
2	30	30	2	6	2	10	10	10	10
3	4	4	-	-	-	5	5	1	1
4	2	2	-	-	-	-	-	-	-
5	30	30	2	2	2	4	4	1	1
6	11	11	2	1	2	-	-	3	3
7	30	30	3	5	2	-	-	7	7
8	30	30	2	2	2	-	-	7	7
9	-	-	6	6	2	3	3	-	-
10	-	-	6	3	2	10	10	5	5
11	30	29	2	2	2	10	10	8	8
12	30	21	4	2	2	10	10	5	5
13	30	30	2	2	2	-	-	10	10
14	30	30	1	2	2	10	10	4	4
15	30	30	2	2	1	8	8	2	2
16	30	30	4	2	1	4	4	1	1
17	30	30	3	2	2	5	5	10	10
18	-	-	2	3	1	5	5	4	4
19	30	30	1	2	2	10	10	1	1
20	30	30	2	2	1	5	5	-	-
Total	437	427	50	50	32	109	109	80	80

1.6.2. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. en muestras de alimento, agua y guano.

Con respecto a la cepa control del ensayo, se observó que el crecimiento fue inhibido por sólo 2 (6,3%), 12 (12,0 %) y 12 (12,0 %) muestras de agua de bebida, alimento y guano, respectivamente (Tabla 24). Al evaluar las diferentes muestras frente a SE, ST, SG y SP, se observó que sólo la muestra de agua (2 muestras) y la de alimento (2 muestras) provenientes del galpón N° 14 inhibieron el crecimiento de *Salmonella*. La muestra de agua inhibió a las 4 serovariedades de *Salmonella* incluidas en el ensayo, mientras que la muestra de alimento sólo inhibió a ST. Por otro lado, no se observó inhibición del crecimiento bacteriano para ninguna de las serovariedades de *Salmonella* en las muestras de guano analizadas (Figura 21).

Tabla 24. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. presentes en muestras de agua, alimento y guano de galpones de aves de postura con antecedentes de TA.

Cepas	N° muestras positivas/N° total de muestras		
	Agua (%)	Alimento (%)	Guano (%)
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis INTA PT 1	2/32 (6,3)	0/100	0/100
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium INTA 06/11	2/32 (6,3)	2/100 (2,0)	0/100
<i>Salmonella</i> biovar Gallinarum INTA 03/121	2/32 (6,3)	0/100	0/100
<i>Salmonella</i> biovar Pullorum INTA 90/142	2/32 (6,3)	0/100	0/100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2/32 (6,3)	12/100 (12,0)	12/100 (12,0)

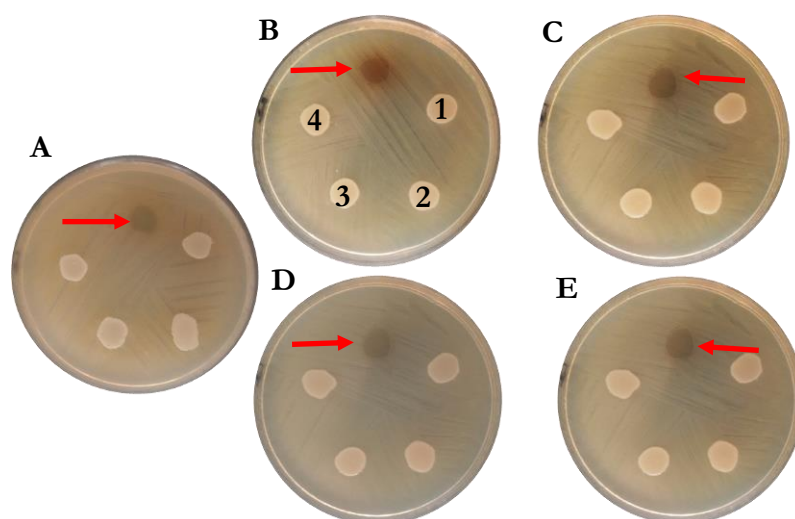


Figura 21. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en muestras de agua y guano. La flecha roja indica zona de inhibición del crecimiento bacteriano en muestras de agua.

A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; B: ST INTA 06/11, C: SE INTA PT1, D: SP INTA 90/142, E: SG INTA 03/121. Los números 1 y 2 corresponden a muestras de guano 1 y su duplicado y los números 3 y 4 corresponden a la muestra de guano 2 y su duplicado.

1.6.3. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. en muestras de hígado y bazo de aves muertas naturalmente y sacrificadas.

Se observó que, de los 109 hígados y bazos de aves sacrificadas, sólo 11 y 6 órganos, respectivamente, mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa control. Por el contrario, de los 80 hígados provenientes de aves muertas naturalmente, sólo una muestra de hígado inhibió el crecimiento de la cepa ensayada y ninguna de las muestras de bazo mostró dicho efecto (Figura 22).

Las muestras en las que se observó efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano pertenecieron a 4 galpones distintos. En uno de ellos (N° 17) no se había informado la utilización de ATM en el tratamiento de las aves. En los 3 galpones restantes, se habían utilizado kanamicina/ gentamicina (N° 9), enrofloxacin (N° 14), y amoxicilina/enrofloxacin (N° 20)

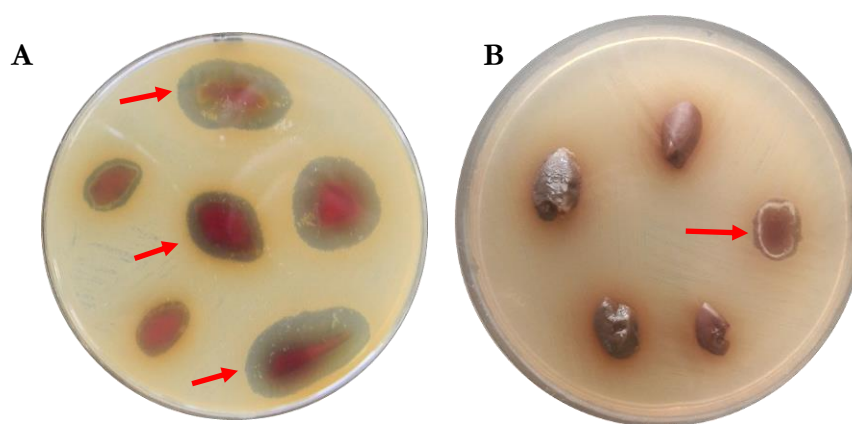


Figura 22 Presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento en muestras hígado (A) y bazo (B) en placas sembradas con *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Las flechas rojas indican inhibición del crecimiento bacteriano.

1.6.4. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. presentes en muestras de clara (CL) y yema (Y).

Los resultados se muestran en la figura 23 y tabla 25. Para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se observó un efecto inhibitorio del crecimiento en el 100 % y 8,6 % de las muestras de CL y Y, respectivamente. Con respecto al tipo de muestra, se observó que las muestras de CL presentaron mayor efecto inhibitorio en las cepas de SE (13,0 %) y SG (8,0 %), mientras que las muestras de Y fueron más inhibitorias del crecimiento en las cepas de ST (15,5 %) y SP (8,0 %). En el galpón N° 6 se observó que las muestras de CL inhibieron el crecimiento de las 4 serovariedades de *Salmonella* ensayadas y en el caso de SG y SP se observó una muestra más con efecto inhibitorio. Por el contrario, las muestras de Y no inhibieron el crecimiento de SG, pero sí de las otras serovariedades de *Salmonella*. Con

respecto al galpón N° 14, se observó una gran cantidad de muestras con sustancias anti-*Salmonella*, aunque fue más marcado en las muestras de Y. La cepa de SG fue la que presentó mayor efecto inhibitorio (29/30) independientemente de la muestra de contenido de huevo ensayada. En este galpón se había realizado tratamiento de las aves afectadas con enrofloxacin. En el galpón 19 se observó el efecto inhibitorio en las muestras de CL sólo para SE, mientras que en el galpón N° 20 se observó que el mayor efecto inhibitorio del crecimiento fue en ST con las muestras de Y. En esto últimos dos galpones se habían utilizado ATM para el tratamiento de las aves, florfenicol (galpón N° 19) y enrofloxacin/amoxicilina (galpón N° 20).

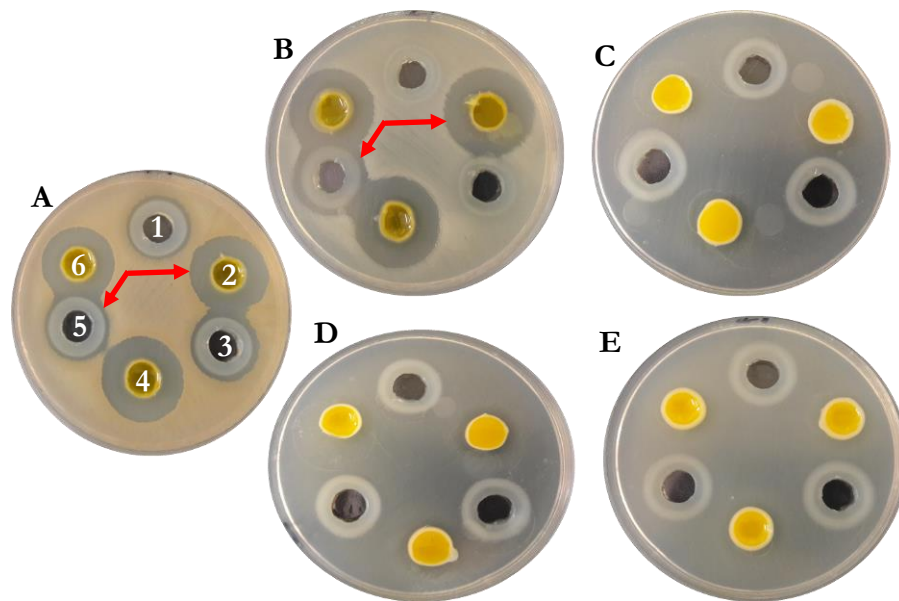


Figura 23. Presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento en muestras de clara y yema. La flecha roja indica halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; B: *Salmonella* ser Typhimurium INTA 06/11, C: *Salmonella* ser. Enteritidis INTA PT1, D: *S.* ser. Gallinarum biovar Pullorum INTA 90/142, E: *S.* ser. Gallinarum biovar Gallinarum INTA 03/121. Los pocillos 1, 3 y 5.

Al evaluar la existencia de diferencias significativas entre el efecto inhibitorio de las muestras de huevo y las cepas ensayadas, se observó que para las muestras de CL tanto BS como SE fueron estadísticamente diferentes entre sí y al compararse con ST, SG y SP ($P < 0,05$). Por otro lado, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ST y SG, pero sí de ambas cepas bacterianas con SP ($P < 0,05$). Por el contrario, en las muestras de Y se observó que ST presentó diferencias estadísticamente significativas al compararse con BS, SE, SG y SP ($P < 0,05$).

Tabla 25. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. presentes en muestras de clara (Cl) y yema (Y) de galpones de aves de postura con antecedentes de TA.

N° galpón	N° muestras positivas/N° total de muestras									
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis INTA PT 1		<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium INTA 06/11		<i>Salmonella</i> biovar Gallinarum INTA 03/121		<i>Salmonella</i> biovar Pullorum INTA 90/142	
	Cl	Y	Cl	Y	Cl	Y	Cl	Y	Cl	Y
1	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
2	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
3	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
4	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
5	30/30	0/30	8/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
6	11/11	7/11	5/11	7/11	5/11	6/11	6/11	0/11	6/11	6/11
7	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
8	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
11	30/30	0/29	0/30	0/29	0/30	0/29	0/30	0/29	0/30	0/29
12	30/30	0/21	1/30	0/21	1/30	0/21	0/30	0/21	0/30	0/21
13	30/30	3/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
14	30/30	27/30	13/30	28/30	13/30	30/30	29/30	29/30	14/15	28/30
15	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
16	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
17	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
19	30/30	0/30	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
20	30/30	30/30	0/30	0/30	3/30	30/30	0/30	0/30	0/30	0/30
TOTAL	437/ 437 ^a	67/ 427 ^a	57/ 437 ^b	35/ 427 ^a	22/ 437 ^{c,d}	66/ 427 ^b	35/ 437 ^{c,d}	29/ 427 ^a	20/ 437 ^d	34/ 427 ^a
Porcent.	100%	15,7%	13,0%	8,2%	5,0%	15,5%	8,0%	6,8%	4,6%	8,0%

^{a,b,c,d} Diferentes letras indican diferencias significativas entre las cepas utilizadas para el mismo tipo de muestra de huevo ensayada (clara o yema).

1.6.5. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* sp. y residuos de quinolonas presentes en el contenido de huevo mediante kit ZEU Explorer y Equinox.

El 21,3% (93/437) de las muestras de CL fueron positivas a la presencia de sustancias inhibidoras (Figura 24 A). Por el contrario, todas las muestras de Y fueron negativas a dicha reacción. Las muestras de CL positivas a la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano fueron evaluadas para determinar la presencia de residuos de quinolonas mediante el kit Equinox (Figura 24 B). Las muestras positivas para las sustancias inhibidoras correspondieron a los galpones N° 14 (24/30), N° 15 (8/30), N° 16 (5/30), N° 17 (3/30), N° 19 (23/30) y N° 20 (30/30). En base a los resultados obtenidos sobre el total

de muestras analizadas, el 63,4 % (59/93) fueron positivos para la presencia de residuos de quinolonas. De estas muestras positivas, se observó que en los galpones N° 14 (23/24) y N° 19 (23/23) fue mayor el porcentaje de reacción positiva para esta familia de antibióticos, donde sólo se había utilizado enrofloxacina en el galpón N° 14, mientras que en el 19 se había informado el uso de florfenicol. Por otro lado, en los galpones N° 15 y 16 se observó un 25 % (2/8) y 100 % (5/5) de muestras positivas a la presencia de residuos de quinolonas. Sin embargo, dichos galpones indicaron no haber utilizado antibióticos al momento del muestreo.

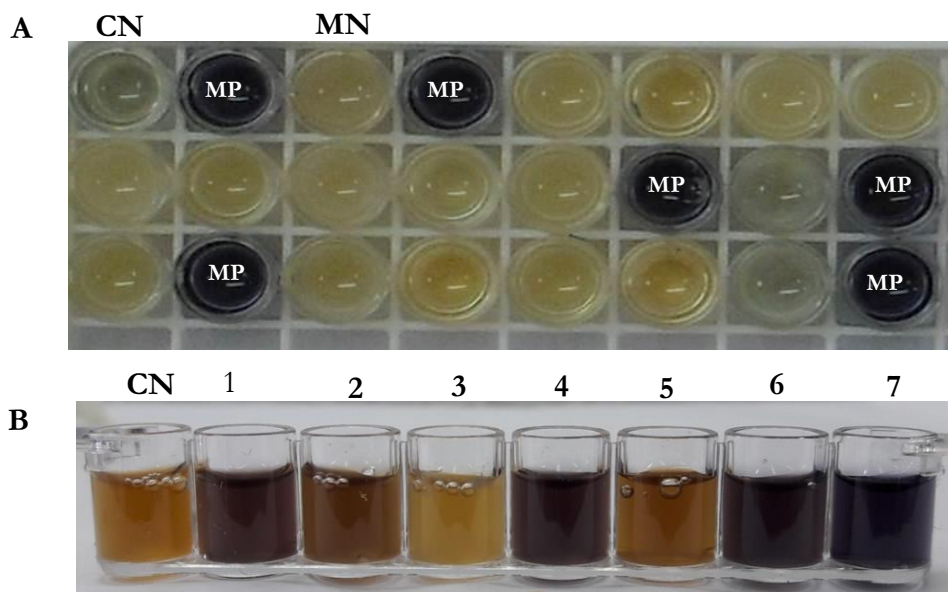


Figura 24. Presencia de sustancias inhibitoras en muestras de clara y yema de huevos provenientes de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar mediante kit comerciales. A: Kit Zeu Explorer. CN: control negativo. MN: muestra negativa, MP: muestra positiva. B. Kit Equinox. CN: control negativo. 2,3 y 5: muestras de clara.

La concordancia entre las muestras de CL y Y para detectar la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano en las 5 cepas utilizadas en el ensayo se muestran en la Tabla 26. El valor del coeficiente Kappa dependió de los serovares ensayados, y estuvo entre ligera ($K=0,33$) a muy buena ($K=0,90$). La concordancia fue ligera para SE INTA PT 1, mientras que para ST INTA 06/11 fue débil. Por el contrario, en los serovares inmóviles, la concordancia fue buena para SP INTA 90/142 y para SG INTA 03/121 fue muy buena. Con respecto a la concordancia entre los métodos utilizados en este punto, estuvo entre ligera ($K=0,33$) a pobre ($K=0,14$), siendo diferentes estadísticamente en todos los casos.

Tabla 26. Concordancia entre las muestras de clara y yema y entre los métodos empleados para la detección de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano para cada uno de los serovares de *Salmonella* y la cepa control *Bacillus subtilis*.

Comparación	Coeficiente Kappa (P ¹)				
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6636	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis INTA PT 1	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium INTA 06/11	<i>Salmonella</i> biovar Gallinarum INTA 03/121	<i>Salmonella</i> biovar Pullorum INTA 90/142
Clara-yema	-	0,33 (0,007)	0,44 (0,001)	0,90 (0,031)	0,67 (0,004)
MCA-MCC	-	0,33 (0,001)	0,16 (0,001)	0,29 (0,001)	0,14 (0,001)

¹El valor de χ^2 se determinó con la prueba de McNemar para muestras pareadas.

MCA: método cualitativo en agar Mueller Hinton.

MCC: método cualitativo comercial Zeu Explorer

1.7. Identificación de factores de riesgo para *Salmonella* sp. en gallinas ponedoras con antecedentes de tifosis aviar.

Los resultados del cuestionario tanto de galpones con antecedentes de TA y las de los galpones negativos a SG se describen en las Tabla 27 (A y B). Se puede observar en la Tabla 27.A que el 35 % y el 15 % de los galpones positivos y negativos a SG, respectivamente, conocían la reglamentación nacional vigente acerca de bioseguridad en los establecimientos de producción avícola. En cuanto al tipo de galpón, se observó que el tipo de galpón tradicional fue del 50 % y 70 % en granjas positivas y negativas a SG, respectivamente. En el 55 % de los galpones positivos a SG, las aves estaban medicadas con diferentes antibióticos (oxitetraciclina, enrofloxacina, gentamicina, kanamicina, fosfomicina, tilosina, florfenicol, amoxicilina), mientras que en los galpones negativos a este biovar sólo el 10 % estaban medicadas (amoxicilina). El 30 % de los galpones positivos a SG presentaba olor a amoníaco dentro del galpón.

Cuando se preguntó sobre las medidas de bioseguridad en los establecimientos avícolas, la mayoría de ellos presentaban el cerco perimetral completo y puerta de entrada (80 % y 90 % de los galpones positivos y negativos a SG, respectivamente). El 50% (galpones positivos) y 65 % (galpones negativos) de los establecimientos cumplían con la distancia de 1.000 m entre las granjas vecinas. Doce galpones positivos a SG (60 %) no presentaron equipos de desinfección de vehículos, jaulas e implementos en el establecimiento y de los 8 galpones restantes sólo en el 50 % estos equipos eran

funcionales. Un porcentaje similar se encontró en los establecimientos con galpones negativos a SG. Ninguno de los establecimientos con galpones positivos a SG encuestados presentó equipamiento para el ingreso de personas externas, ni registro de visitas a las granjas a diferencia de los establecimientos con galpones negativos a SG donde el 35 % y 2 % si lo poseían, respectivamente. En ambos tipos de galpones, más del 80 % de los establecimientos presentaban otras especies circulantes en el predio (caninos, felinos, bovinos, equinos, porcino y ovino).

Los principales sistemas de eliminación de cadáveres en galpones positivos y negativos a SG fueron de fosa abierta (35 % y 25 %), incineración abierta y/o cerrada (25 %) y fosa cerrada (15 % y 30 %), respectivamente. El 35 % de los galpones positivos a SG y el 85 % de los galpones negativos al mismo biovar realizaban control de moscas. Sin embargo, en el 60 % de los galpones positivos a SG se observó la presencia de moscas. Por otro lado, un porcentaje mayor realizaban el control de roedores (75 % y 95 % en galpones positivos y negativos a SG, respectivamente). En los galpones positivos a SG contestaron que era efectivo dicho tratamiento el 90 %. Sin embargo, en el 2 % de los galpones se observaron cuevas de roedores.

En más del 50 % de los galpones elaboraban su propio alimento y el porcentaje restante realizaba la compra a terceros. En general, la presentación del mismo fue en forma de harina (95 %) y *pellet* (75 %) en los galpones positivos y negativos a SG, respectivamente. Sólo el 25 % de los galpones positivos a SG realizaba análisis microbiológicos a las materias primas. Por otro lado, en el 75 % y 50 % de los galpones positivos y negativos a SG, respectivamente, desconocían si en el alimento se usaban acidificantes, mientras que el 65 % (galpones positivos a SG) y 60 % (galpones negativos a SG) respondieron que sí usaban secuestrantes de micotoxinas.

Tabla 27. A. Resultados generales de la encuesta realizada en las 20 granjas muestreadas con antecedentes de tifosis aviar y 20 granjas negativas a tifosis aviar muestreadas previamente. Se indica el número de galpones con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario.

Aspectos de la encuesta	N° de galpones con TA (% sobre total de galpones)	N° de galpones sin TA (% sobre total de galpones)
¿Conoce la reglamentación 542/2010?	7 (35)	3 (15)
GALPON A MUESTREAR		
Tipo de galpón		
Piso	4 (20)	0
Tradicional	10 (50)	14 (70)
Automático	6 (30)	6 (30)
Aves medicadas con antibióticos	11 (55)	2 (10)
Olor a amoníaco	6 (30)	0
MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD		
Cerco perimetral y puerta de entrada	16 (80)	18 (90)
Cumplimiento de distancias de separación con granjas vecinas	10 (50)	13 (65)
Posee equipos de desinfección (vehículos, equipos, jaulas e implementos)?	8 (40)	7 (35)
Funcionamiento de los equipos de desinfección	4 (50)	0
Posee equipamiento para ingreso de personas	0	7 (35)
Posee registro foliado	0	2 (10)
Existen otras especies animales en el predio	19 (95)	16 (80)
SISTEMA DE ELIMINACIÓN DE CADÁVERES		
Sistema de eliminación de cadáveres		
Composta	2 (10)	1 (5)
Fosa abierta	7 (35)	5 (25)
Fosa abierta + incineración abierta	1 (5)	0
Fosa cerrada	3 (15)	6 (30)
Incineración abierta y/o cerrada	5 (25)	5 (25)
Reutilización	1 (5)	0
otro sistema (Pozo)	1 (5)	3 (15)
Control de moscas	7 (35)	17 (85)
Se considera efectivo	7 (100)	0
Existencia visual de moscas	12 (60)	-
Control de roedores	15 (75)	19 (95)
Se considera efectivo	14 (90)	0
Existencia visual de cuevas de roedores	2 (10)	0
ALIMENTO, AGUA, HUEVOS Y GUANO		
Alimento		
Elaboración propia	14 (70)	11 (55)
Compra a terceros	6 (30)	9 (45)
Harina	19 (95)	-
Pellet	0	15 (75)
Ambos	1 (5)	5 (25)
Realización de análisis microbiológicos de las materias primas	5 (25)	0
Uso de acidificantes		
Si	0	3 (15)
Desconoce	15 (75)	10 (50)
Uso de secuestrantes de micotoxinas		
Si	13 (65)	12 (60)
Desconoce	5 (25)	6 (30)

En la Tabla 27.B se observa que un bajo porcentaje de galpones positivos a SG realizaban el análisis microbiológico del agua (15 %) a diferencia de los galpones negativos a SG, donde el 65 % de los mismos sí realizaban dicho análisis al agua de bebida. En la

mayoría de ambos tipos de galpones, el almacenamiento de los huevos se realizaba en una sala independiente y el 60 % y 95 % de los galpones positivos y negativos a SG, respectivamente, reutilizaba los maples de cartón. Con respecto al guano que se producía en los galpones, un bajo porcentaje de galpones positivos a SG destinaban el guano fuera del predio. Además, el 75 % de este guano se encontraba en estado húmedo.

Con respecto al área de sanidad de los galpones positivos a SG, el 65 % de ellas utilizaron antibióticos 3 semanas antes de realizar el muestreo, mientras que, en los galpones negativos a SG sólo el 10 % habían informado el uso de antibióticos. Por otro lado, el 30 % y 85 % de los galpones positivos y negativos a SG, respectivamente, usaban vacuna contra SG, siendo la vacuna utilizada la 9R. Por lo general, la mayoría del personal (dueño o empleado) vivía en el mismo predio de los galpones positivos a SG y sólo en un establecimiento un empleado indicó haber sentido síntomas como dolor abdominal y diarrea durante días previos a la visita a la granja, pero no realizó consulta médica por ello.

Tabla 27.B. Resultados generales de la encuesta realizada en las 20 granjas muestreadas con antecedentes de tifosis aviar y 20 granjas negativas a tifosis aviar muestreadas previamente. Se indica el número de galpones con respuestas afirmativas para cada una de las preguntas del cuestionario.

Aspectos de la encuesta	Nº de galpones con TA (% sobre total de galpones)	Nº de galpones sin TA (% sobre total de galpones)
Realización de análisis del agua	3 (15)	13 (65)
Almacenamiento de los huevos		
Mismo galpón	1 (5)	0
Sala independiente	18 (90)	20 (100)
Recría	1 (5)	0
Reutilización del maple	16 (60)	19 (95)
Destino del guano		
Campo propio	16 (80)	0
Fuera del predio	4 (20)	0
Estado del guano		
Húmedo	15 (75)	0
Seco	5 (25)	0
SANIDAD		
Uso de antibióticos las últimas 3 semanas	13 (65)	2 (10)
Vacunación contra <i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum	6 (30)	17 (85)
PERSONAL DE LA GRANJA		
Alojamiento en el mismo predio?	17 (85)	0
Presentación de algunos de estos síntomas		
Dolor abdominal	1 (5)	0
Fiebre entre 8 a 72 h	0	0
Escalofríos	0	0
Náuseas y/o vómitos	0	0
Diarrea	1 (5)	0
Consulta al médico por los síntomas mencionados anteriormente	0	0

En la Tabla 28 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: N° de galpones categorizados (< 5 galpones y ≥ 5 galpones), equipamiento para ingreso de personas, eliminación de cadáveres, control de moscas, realización de análisis de agua, cantidad de aves categorizadas (< 10.000 y ≥ 10.000), cantidad de aves por jaula categorizadas (< 5 aves y ≥ 5 aves y piso), edad de las aves categorizadas (< 72 semanas y ≥ 72 semanas), uso de medicación y uso de vacuna.

Tabla 28. Resultados del análisis univariado para la identificación de los factores de riesgo para la presencia de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum en los galpones con antecedentes de tifosis aviar.

Variable	n	% de galpones positivos a <i>Salmonella</i> biovar Gallinarum	Valor P
Departamento			
Paraná y La Capital	19	52,6	0,752
Resto de los departamentos de Entre Ríos	21	47,6	
N° de galpones			
< 5 galpones	19	63,2	0,113
≥ 5 galpones y piso	21	38,1	
Dice tener conocimiento de la reglamentación N° 542/2010			
No	30	43,3	0,273
Si	10	70,0	
Posee cerco perimetral			
No	6	66,7	0,661
Si	34	47,1	
Cumplimiento de distancia con las granjas vecinas?			
No	16	62,5	0,242
Si	23	43,5	
Posee equipo de desinfección			
No	25	48,0	0,744
Si	15	53,3	
Posee equipo para el ingreso de personas			
No	33	60,6	0,008
Si	7	0,0	
Otras especies en el predio			
No	5	20,0	0,342
Si	35	54,3	
Eliminación de cadáveres			
Sistema abierto	20	65,0	0,058
Sistema cerrado	20	35,0	
Realiza control de moscas			
No	16	81,3	0,003
Si	24	29,2	
Realiza control de roedores			
No	6	83,3	0,182
Si	34	44,1	
Posee registro foliado			
No	38	52,6	0,487
Si	2	0,0	

Continuación de la Tabla 28.

Variable	n	% de galpones positivos a <i>Salmonella</i> biovar Gallinarum	Valor P
Elaboración del alimento			
Elaboración propia	25	56,0	0,327
Compra a terceros	15	40,0	
Usa secuestrantes de micotoxinas			
No	4	50,0	1,000
Si	24	54,2	
Usa acidificantes			
No	12	41,7	0,505
Si	3	0,0	
Presentación del alimento			
Harina	34	55,9	0,182
Pellet o ambos	6	16,7	
Realiza análisis del agua			
No	24	70,8	0,003
Si	16	18,8	
Reutiliza el maple			
No	5	80,0	0,342
Si	35	45,7	
Cantidad de aves categorizadas			
< a 10.000	18	33,3	0,057
≥ a 10.000	22	63,6	
Cantidad de aves por jaula categorizada			
2 a 4 aves	26	36,0	0,048
5 y a piso	14	71,4	
Edad de las aves categorizadas			
< a 72 semanas	25	60,0	0,146
≥ a 72 semanas	15	35,7	
Usa medicación			
No	27	33,3	0,006
Si	13	84,6	
Realiza vacunación contra <i>Salmonella</i> ser. Gallinarum biovar Gallinarum			
No	15	92,9	0,000
Si	25	26,1	

En la Tabla 29 se detallan los resultados del análisis multivariado de regresión logística. De acuerdo con estos resultados, el uso de vacunas y el control de moscas resultaron significativas, con un valor de P de 0,002 y 0,010, respectivamente. La razón de probabilidades (OR) para el uso de vacuna fue de 92,85. Esto significa que los galpones de las granjas que no realizan vacunación a las aves poseen 92,85 veces más riesgo de presencia de SG que aquellos que sí lo hacen. Por otro lado, aquellas granjas que no realizan un control de moscas poseen 25,06 veces más probabilidades de tener SG con respecto a aquellas granjas que sí lo hacen. Las variables N° de galpones categorizados (< 5 galpones y ≥ 5 galpones), equipamiento para ingreso de personas, eliminación de cadáveres, realización de análisis de agua, cantidad de aves categorizadas (< 10.000 y ≥ 10.000), cantidad de aves

por jaula categorizadas (< 5 aves y ≥ 5 aves y piso), edad de las aves categorizadas (< 72 semanas y ≥ 72 semanas) y uso de medicación, 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 control de moscas estaba asociado a equipamiento para el ingreso de personas ($P= 0,029$), y control de roedores ($P= 0,029$). La variable vacunación estuvo asociada a uso de medicación ($P= 0,006$). Por otro lado, N° de galpones, y análisis de agua no presentaron asociación con ninguna de las otras variables.

Tabla 29. Resultado del análisis multivariado para la identificación de los factores de riesgo ($P < 0,05$) para la presencia de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum en galpones con antecedentes de tifosis aviar.

Variable	OR*	Valor P
N° de galpones	5,63	0,263
≥ 5 galpones		
< 5 galpones y piso (ref.)**		
Posee equipo para el ingreso de personas	$< 0,00$	1,000
Si		
No (ref.)		
Eliminación de cadáveres	1,50	0,850
Sistema cerrado		
Sistema abierto (ref.)		
Realiza control de moscas	25,06	0,010
Si		
No (ref.)		
Realiza análisis del agua	1,70	1,000
Si		
No (ref.)		
Cantidad de aves categorizadas	0,18	0,140
$\geq a 10.000$		
$< a 10.000$ (ref.)		
Cantidad de aves por jaula categorizada	$< 0,00$	1,000
5 y a piso		
2 a 4 aves (ref.)		
Edad de las aves categorizadas	1,40	0,818
$\geq a 72$ semanas		
$< a 72$ semanas (ref.)		
Usa medicación	0,41	0,463
Si		
No (ref.)		
Realiza vacunación	92,85	0,002
Si		
No (ref.)		

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

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

2. Muestreo pasivo.

2.1. Muestras provenientes de aves.

Se analizaron un total de 363 muestras provenientes de 49 protocolos ingresados al laboratorio correspondientes a las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Jujuy, Mendoza, Santa Fe, Salta y Tucumán. Los resultados se muestran en la tabla 30. El 89,8 % de las muestras (44/49) fueron positivos a la presencia de SG confirmados mediante pruebas bioquímicas. Por otro lado, todos los aislamientos fueron negativos a la reacción con acriflavina.

Tabla 30. Muestras ingresadas al laboratorio para el diagnóstico de tifosis aviar provenientes de diferentes provincias de la República Argentina durante el período de febrero de 2014 a noviembre 2016.

Provincia	Tipo y número de muestras				N° de establecimientos positivos a SG /N° de establecimientos
	Patas	Hígado	Bazo	Ave muerta	
Buenos Aires	8	-	-	-	1/1
Entre Ríos	121	55	39	20	32/36
Jujuy	17	-	-	-	2/2
Mendoza	34	-	-	-	5/5
Santa Fe	17	-	-	-	1/1
Salta	7	-	-	-	0/1
Tucumán	41	4	-	-	3/3
TOTAL	245	59	39	20	44/49

2.2. Aislamiento y/o confirmación de *Salmonella* sp. provenientes de pacientes humanos y/o ambientes hospitalarios.

De los 26 aislamientos de *Salmonella* tipo móviles enviadas al laboratorio, provenientes de hospitales públicos y sanatorios privados de la provincia de Entre Ríos, se confirmó mediante pruebas bioquímicas el género. Por otro lado, al realizar la serotipificación se observó que el 73,1 % (19/26) correspondieron a ST, el 19,2 % a *S.* ser. Schwarzengrund (5/26) y el 7,7 % correspondieron a SE (2/26).

3. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* sp.

En este punto se seleccionaron un total de 204 aislamientos de SG, 164 provenientes del muestreo activo y 40 del muestreo pasivo (Tabla 31). Por otro lado, se incluyeron en este punto un total de 67 aislamientos de *Salmonella* tipo móviles de las cuales 41 y 26 aislamientos se obtuvieron del muestreo activo y pasivo, respectivamente (Tabla 32).

Tabla 31. Cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum seleccionadas para el estudio de sensibilidad a antibióticos.

Tipo de muestreo	Tipo de producción	Provincia	Año del aislamiento	N° aislamientos	
Activo	Ponedoras	Entre Ríos	2013	10	
			2014	8	
			2015	75	
			2016	41	
		Santa Fe	2014	10	
			2015	20	
Pasivo	Ponedoras	Entre Ríos	2014	5	
	Ponedoras		2015	4	
	Parrilleros			6	
	Ponedoras		2016	4	
	Reproductoras			2	
	Ponedoras			2	
	Santa Fe	Ponedoras	2014	2	
			Mendoza	2015	4
				2016	2
			Jujuy	2016	2
			Tucumán	2015	4
				2016	2
Buenos Aires	2016	1			
Total				204	

Tabla 32. Cepas de *Salmonella* móviles incluidas en el estudio de sensibilidad a antibióticos.

Tipo de muestreo	Origen	Provincia	Año del aislamiento	Serovariedad	Nº de aislamientos
Activo	Ponedoras	Entre Ríos	2014	Cerro	2
				Schwarzengrund	3
				Javiana	1
			2015	Enteritidis	4
				Infantis	2
				Montevideo	1
				Derby	6
				Corvallis	2
				Heidelberg	1
				Livingstone	9
			2016	Corvallis	1
				Livingstone	4
				Mbandaka	1
Cerro	4				
Pasivo	Pacientes humanos	Entre Ríos	2014	Typhimurium	7
				Enteritidis	1
			2015	Typhimurium	12
				Schwarzengrund	5
			2017	Enteritidis	1
			TOTAL		

3.1. Caracterización fenotípica de la resistencia a diferentes antibióticos.

En todos los aislamientos de SG (Figura 25) provenientes del muestreo activo (independientemente del origen) se observó que presentaron una sensibilidad entre 60 y 100% para los ATM β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, β -lactámicos/inhibidor de β -lactamasas), tetraciclinas, fenicoles, aminoglucósidos (excepto estreptomicina), inhibidores de la vía del folato, polimixinas, fosfomicinas y macrólidos (excepto eritromicina). La sensibilidad intermedia de las cepas para estreptomicina fue del 71 %. Con respecto al grupo de las quinolonas, se observó que el 100 % de las cepas fueron resistentes al ácido nalidíxico (halos de 6 mm). Para el grupo de las fluoroquinolonas, la sensibilidad intermedia fue de 53 % y 58 %, y la resistencia fue de 46 % y 24 % para ciprofloxacina y enrofloxacin, respectivamente. Por el contrario, para norfloxacina se observó un 41% y 36% de cepas sensibles y resistentes, respectivamente. Con respecto a eritromicina todos los aislamientos fueron resistentes a dicho ATM.

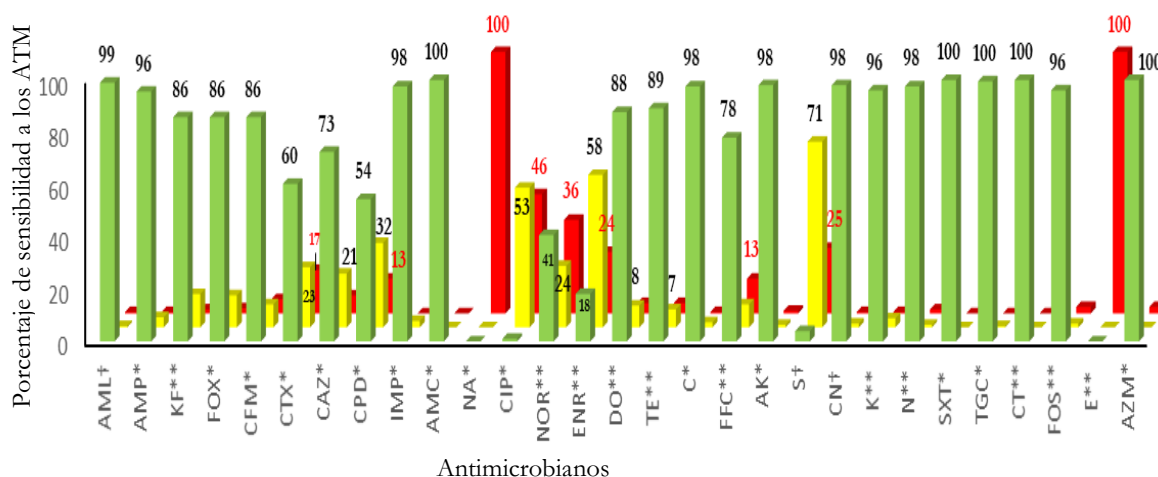


Figura 25. Sensibilidad a diferentes antimicrobianos (ATM) en cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum.

Los números indican el porcentaje de cepas. Verde: cepas sensibles; Amarillo: cepas con sensibilidad intermedia; Rojo: cepas resistentes. **AML**: Amoxicilina; **AMP**: Ampicilina; **KF**: Cefalotina; **FOX**: Cefoxitima; **CFM**: Cefixima; **CTX**: Cefotaxima; **CAZ**: Ceftazidima; **CPD**: Cefpodoxima; **IMP**: Imipenem; **AMC**: Amoxicilina/Ácido clavulánico; **AN**: Ácido nalidixico; **CIP**: Ciprofloxacina; **NOR**: Norfloxacina; **ENR**: Enrofloxacina; **DO**: Doxiciclina; **TE**: Tetraciclina; **C**: Cloranfenicol; **FFC**: Florfenicol; **AK**: Amicacina; **S**: Estreptomina; **CN**: Gentamicina; **K**: Kanamicina; **N**: Neomicina; **SXT**: Sulfametoxazol/Trimetoprima; **TGC**: Tigeciclina; **CT**: Colistina; **FOS**: Fosfomicina; **E**: Eritromicina; **AZM**: Azitromicina.

Los coeficientes RMAs en las cepas de SG estuvieron entre 0,07 y 0,45. Se observó que 136 aislamientos de SG presentaron resistencia a dos o más ATM analizados con diferentes patrones de resistencia (Tabla 33). Dentro de éstos, se observó que los más comunes fueron NA-E (68); NA-E-S (24); AN-E-CIP-NOR (13); AN-E-CIP (12). Con respecto a la clasificación de los aislamientos como MDR (multidroga resistentes) el 18,1 % (37/204) fueron resistentes al menos a un ATM de 3 categorías diferentes. Con respecto a los aislamientos de SG provenientes del muestreo activo, no se observó diferencia entre el porcentaje de cepas MDR en aquellas cepas provenientes de granjas que indicaron haber usado ATM con respecto a aquellas que no lo usaron.

Tabla 33. Perfiles de resistencia a antimicrobianos e índice de resistencia múltiple a antibióticos (RMAs) en aislamientos de SG provenientes de galpones de aves de postura con antecedentes de TA.

N° de ATM	N° de aislamientos	Patrón de multiresistencia	RMAs		
2	68	AN-E	0,07		
	12	AN-E-CIP			
3	2	AN-E-CTX	0,10		
	2	AN-E-ENR			
	5	AN-E-NOR			
	24	AN-E-S			
	1	AN-E-CIP-ENR			
4	13	AN-E-CIP-NOR	0,14		
	1	AN-E-CIP-S			
	1	AN-E-CFM-CPD			
	1	AN-E-CPD-CIP			
	1	AN-E-CTX-CIP			
	1	AN-E-ENR-S			
	1	AN-E-FOX-CIP			
	2	AN-E-NOR-S			
	5	5		AN-E-CIP-NOR-ENR	0,17
		1		AN-E-CIP-ENR-S	
2		AN-E-CIP-NOR-S			
1		AN-E-CPD-CIP-NOR			
1		AN-E-CTX-CIP-ENR			
1		AN-E-CTX-CIP-FOS			
1		AN-E-CTX-CIP-NOR			
1		AN-E-CTX-CPD-ENR			
3		AN-E-DO-TE-S			
1		AN-E-NOR-DO-TE			
6		1	AN-E-CIP-NOR-ENR-FOS	0,21	
	1	AN-E-CAZ-CIP-NOR-FFC			
	1	AN-E-CTX-CIP-NOR-FFC			
	1	AN-E-CPD-CIP-NOR-ENR-S			
	1	AN-E-CIP-NOR-ENR-S			
	1	AN-E-CTX-CAZ-CIP-NOR			
	1	AN-E-CTX-CIP-NOR-ENR			
	1	AN-E-CIP-ENR-DO-TE			
	1	AN-E-CTX-CAZ-CIP-ENR			
	3	AN-E-CIP-ENR-FFC-S			
	3	AN-E-CFM-CIP-NOR-AZM			
	4	AN-E-CIP-NOR-ENR-FFC			
	4	AN-E-CTX-CPD-CIP-NOR			
	7	2	AN-E-CIP-NOR-ENR-FFC-S		0,24
1		AN-E-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC			
1		AN-E-CTX-CIP-NOR-FFC-S			
1		AN-E-CAZ-CIP-NOR-ENR-FFC			
1		AN-E-CTX-CPD-CIP-FOS-AZM			
1		AN-E-CFM-CIP-NOR-ENR-AZM			
1		AN-E-CTX-CAZ-CIP-NOR-ENR			
8	1	AN-E-CTX-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC	0,28		
	1	AN-E-CFM-CTX-CPD-CIP-NOR-ENR			
	2	AN-E-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC-S			
	2	AN-E-CTX-CPD-CIP-NOR-ENR-FOS			
	4	AN-E-CTX-CAZ-CPD-CIP-NOR-ENR			
9	1	AN-E-CFM-CAZ-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC	0,31		
	1	AN-E-CFM-CTX-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC			
10	1	AN-E-AML-AMP-CIP-DO-TE-CN-K-N	0,34		
	1	AN-E-CTX-CAZ-CPD-CIP-NOR-ENR-C-FFC			
11	1	AN-E-CTX-CAZ-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC-S	0,38		
	1	AN-E-CFM-CTX-CAZ-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC-S			
13	1	AN-E-KF-FOX-CTX-CAZ-CPD-CIP-NOR-ENR-FFC	0,45		
	1	AN-E-KF-FOX-CFM-CAZ-CPD-CIP-DO-TE-AK-S-N			
	1	AN-E-KF-FOX-CFM-CTX-CAZ-CPD-DO-TE-AK-S-N			

En las cepas de *Salmonella* móviles (Figura 26), se observó que todas fueron sensibles a las penicilinas, cefalosporinas (excepto a cefexima, cefotaxima y ceftazidima), β -lactámicos/inhibidor de β -lactamasas, quinolonas (excepto ciprofloxacina y enrofloxacina), tetraciclinas, fenicoles, aminoglucósidos (excepto estreptomomicina y neomicina), inhibidores de la vía del folato, y polimixinas. Se observaron resistencia a cefixima (1/41), estreptomomicina (2/41), fosfomicina (3/41), azitromicina (1/41) y eritromicina (41/41). Por otro lado, a diferencia de las cepas de SG que presentaron resistencia al ácido nalidíxico, las cepas móviles fueron todas sensibles a ese ATM (41/41).

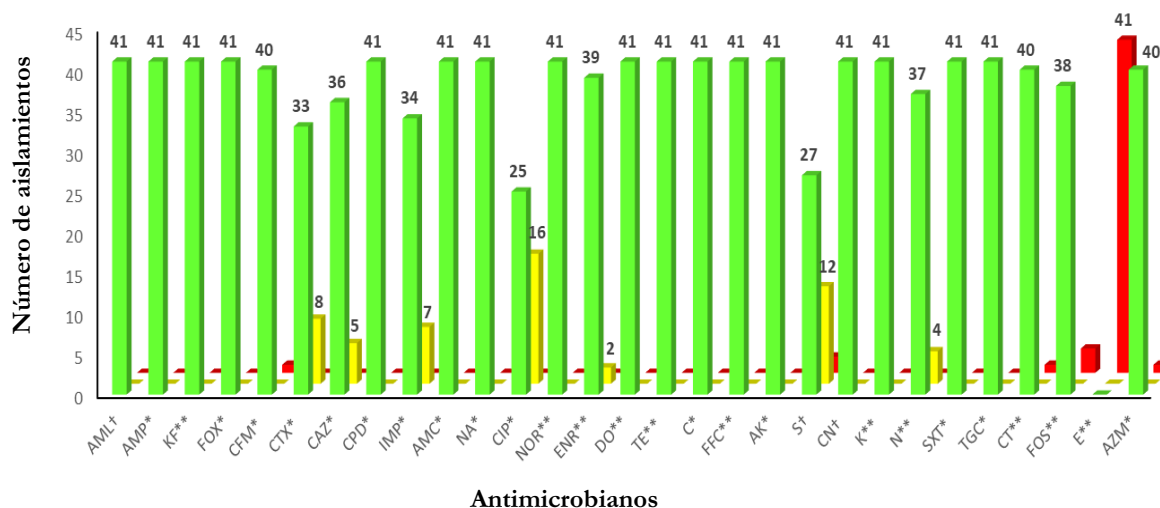


Figura 26. Sensibilidad a diferentes antimicrobianos en cepas de salmonelas tipo móvil aisladas de galpones de aves de postura con antecedentes de TA.

Los números indican la cantidad de aislamientos. Verde: cepas sensibles; Amarillo: cepas con sensibilidad intermedia; Rojo: cepas resistentes. **AML**: Amoxicilina; **AMP**: Ampicilina; **KF**: Cefalotina; **FOX**: Cefoxitima; **CFM**: Cefixima; **CTX**: Cefotaxima; **CAZ**: Ceftazidima; **CPD**: Cefpodoxima; **IMP**: Imipenem; **AMC**: Amoxicilina/Ácido clavulánico; **AN**: Ácido nalidíxico; **CIP**: Ciprofloxacina; **NOR**: Norfloxacina; **ENR**: Enrofloxacina; **DO**: Doxiciclina; **TE**: Tetraciclina; **C**: Cloranfenicol; **FFC**: Florfenicol; **AK**: Amicacina; **S**: Estreptomomicina; **CN**: Gentamicina; **K**: Kanamicina; **N**: Neomicina; **SXT**: Sulfametoxazol/Trimetoprima; **TGC**: Tigeciclina; **CT**: Colistina; **FOS**: Fosfomicina; **E**: Eritromicina; **AZM**: Azitromicina.

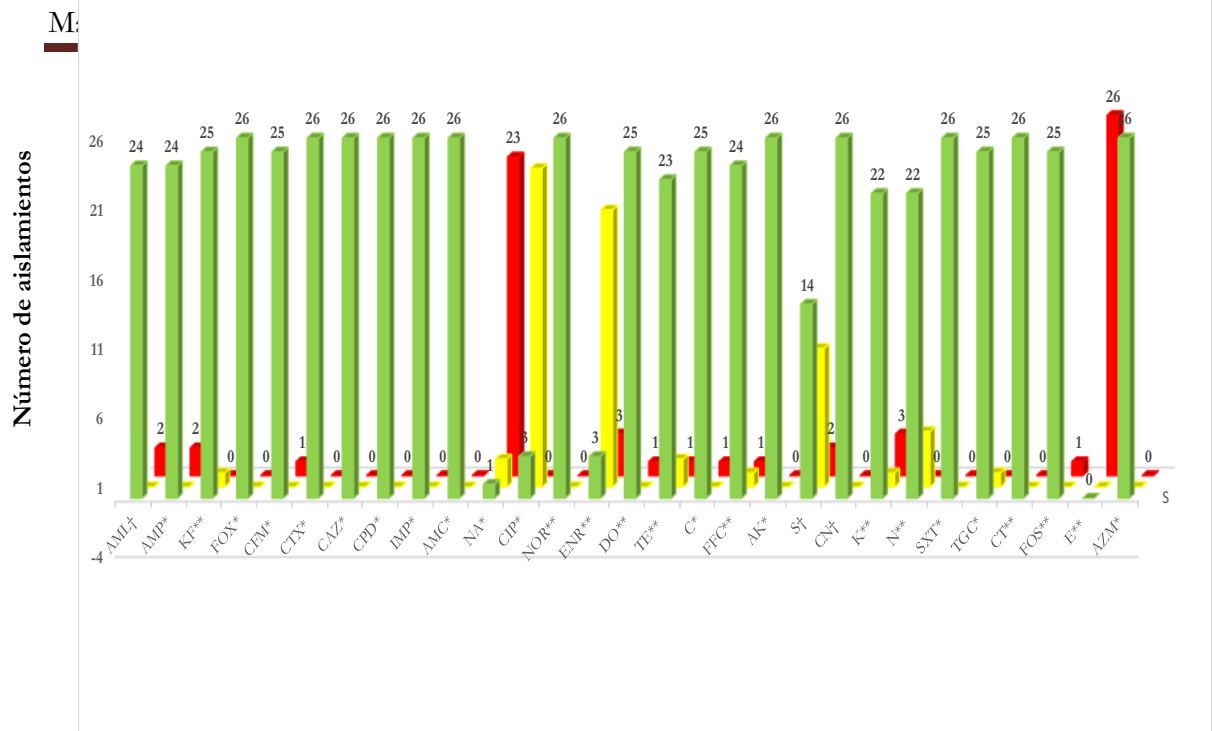
El coeficiente de RMAs estuvo de 0,07 y 0,10. Se observó que 6 aislamientos de *Salmonella* presentaron resistencia a dos o más categorías de ATM analizados con diferentes patrones de resistencia (Tabla 34). Dentro de los patrones de resistencia, se observó que *S. ser. Schwarzengrund* (3 aislamientos) presentó dos patrones distintos (FOS-E y S-FOS-E), y todos los aislamientos pertenecieron al mismo galpón. Por otro lado, *S. ser. Cerro* (CT-E) y *S. ser. Livingstone* (S-E) presentaron resistencia a 2 categorías de ATM, siendo ambas aisladas del mismo galpón muestreado (Tabla 38). No se observaron cepas MDR.

Tabla 34. Perfiles de resistencia a antibióticos y coeficiente de resistencia múltiple a antibióticos (RMAs) en aislamientos de *Salmonella* tipo móviles provenientes de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.

Nº de ATM	Nº de aislamientos	Serovariedad	Patrón de multiresistencia	RMAs
2	2	Schwarzengrund ¹	FOS-E	0,07
	1	Cerro ²	CT-E	
	1	Livingstone ²	S-E	
	1	Livingstone	CFM-E	
3	1	Schwarzengrund ¹	S-FOS-E	0,10

^{1,2} Corresponden a aislamientos de un mismo galpón

Con respecto a las cepas de *Salmonella* tipo móviles enviadas al laboratorio provenientes de hospitales y sanatorios, del total de aislamientos analizados (Figura 27), todas las cepas fueron sensibles a ceftazidima, cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima, imipenem, amoxicilina/ácido clavulánico, norfloxacin, amicacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprima, colistina y azitromicina. Se observaron resistencia a amoxicilina (2/26), ampicilina (2/26), cefexima (1/26), ácido nalidíxico (23/26), enrofloxacin (3/26), doxiciclina (1/26), tetraciclina (1/26), cloranfenicol (1/26), florfenicol (1/26), estreptomycin (2/26), kanamicina (3/26), fosfomicina (1/26), y eritromicina (26/26). El coeficiente de RMAs (Tabla 35) estuvo entre 0,07 y 0,28. Se observó que 21 aislamientos de *Salmonella* presentaron resistencia al menos a un ATM de categorías diferentes. Dentro de los patrones de resistencia, se observó que de los 16 aislamientos de ST, 12 presentaron el mismo patrón (NA-E) y 4 aislamientos presentaron resistencia a 3 ATM. Con respecto a *S. ser. Schwarzengrund*, de los 4 aislamientos multiresistentes sólo 1 aislamiento se clasificó como MDR ya que presentó resistencia a 3 categorías de ATM (penicilinas, quinolonas y aminoglucósidos). Por otro lado, en el caso de SE se clasificó como MDR ya que se observó un patrón de resistencia a 4 categorías distintas de ATM (penicilinas, tetraciclinas, fenicoles, derivados del ácido fosfónico), dicho aislamiento provino del ambiente de una sala de parto de un hospital público.



intermedia; Rojo: cepas resistentes. **AML**: Amoxicilina; **AMP**: Ampicilina; **KF**: Cefalotina; **FOX**: Cefoxitima; **CFM**: Cefixima; **CTX**: Cefotaxima; **CAZ**: Ceftazidima; **CPD**: Cefpodoxima; **IMP**: Imipenem; **AMC**: Amoxicilina/Ácido clavulánico; **AN**: Ácido nalidíxico; **CIP**: Ciprofloxacina; **NOR**: Norfloxacina; **ENR**: Enrofloxacina; **DO**: Doxiciclina; **TE**: Tetraciclina; **C**: Cloranfenicol; **FFC**: Florfenicol; **AK**: Amicacina; **S**: Estreptomicina; **CN**: Gentamicina; **K**: Kanamicina; **N**: Neomicina; **SXT**: Sulfametoxazol/Trimetoprima; **TGC**: Tigeciclina; **CT**: Colistina; **FOS**: Fosfomicina; **E**: Eritromicina; **AZM**: Azitromicina.

Tabla 35. Perfiles de resistencia a antimicrobianos (ATM) y coeficiente de resistencia múltiple a antibióticos (RMAs) en aislamientos de *Salmonella* móviles provenientes de pacientes humanos.

Nº de ATM	Nº de aislamientos	Serovariedad	Patrón de multirresistencia	RMAs
2	14	Typhimurium (12) y Schwarzengrund (2)	AN-E	0,07
3	2	Typhimurium	AN-S-E	0,10
	2	Typhimurium y Schwarzengrund	AN-ENR-E	
	1	Typhimurium	AN-K-E	
4	1	Typhimurium	AN-CFM-E	0,14
	1	Schwarzengrund	AN-ENR-K-E	
8	1	Enteritidis	AN-AML-AMP-K-E	0,17
	1		AML-AMP-DO-TE-C-FFC-FOS-E	

3.2. Caracterización fenotípica de la presencia de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y caracterización molecular de β -lactamasas tipo CTX-M 2 en cepas de *Salmonella* sp.

De todas las cepas de *Salmonella* sp. ensayadas, sólo 23 cepas de SG presentaron el patrón de selección para los 3 ATM: cefpodoxima, ceftazidime y cefotaxima. El análisis fenotípico dio negativo a la producción de BLEE. En todos esos casos, el gen *bla*_{CTX-M 2} dio negativo.

3.3. Caracterización fenotípica y genotípica de la presencia de genes de resistencia a quinolonas.

Se analizaron todos los aislamientos que fueron resistentes al menos a un ATM del grupo de quinolonas. Fenotípicamente, los aislamientos de SG dieron halos de 6 mm de diámetro con el disco de ácido nalidíxico (AN), mientras que en los aislamientos de *Salmonella* tipo móviles los halos estuvieron entre 9 y 12 mm de diámetro. Al estudiar la presencia del gen *gyrA* en las cepas de *Salmonella* se observó que las móviles fueron negativas, mientras que el gen estuvo presente en los 204 (100 %) aislamientos de SG estudiados (Figura 28).

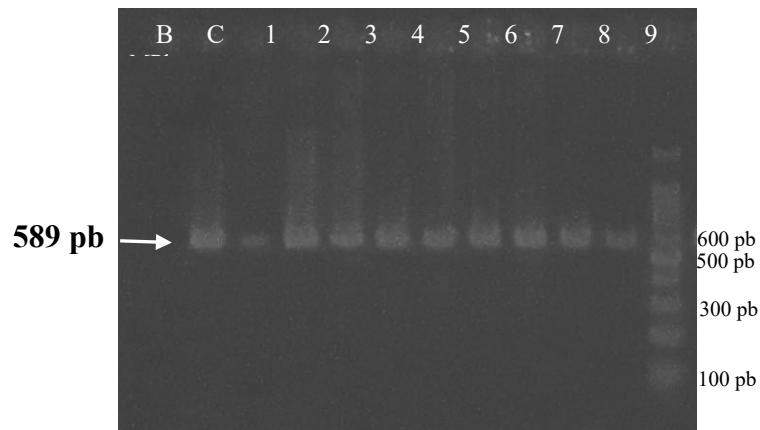


Figura 28 Amplicones obtenidos por PCR para el gen *gyrA* utilizando cepas de *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG). B: blanco de la reacción. C: Control positivo SG CUB 226/13. 1-9: cepas de SG. MPb: marcador de pares de bases.

De los 204 aislamientos de SG en los que se evaluó la presencia del gen *qnrB*, el 100 % fueron negativos a la presencia de este gen. En las cepas móviles provenientes de pacientes humanos, el 82 % (18/22) presentaron el gen *qnrB*, de los cuales 13 aislamientos pertenecieron a ST y 5 a *S. ser. Schwanzengrund* (Figura 29).

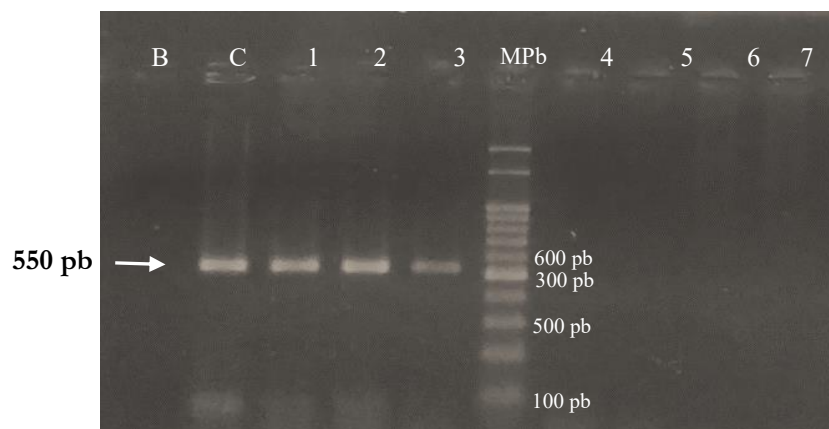


Figura 29 Amplicones obtenidos por PCR para el gen *qnrB*. B: blanco de la reacción. C: Control positivo *S. ser. Typhimurium* 862 A (CUB 13/16) de humanos. MPb: marcador de pares de bases. Calles N° 1-7: aislamientos de *Salmonella* móviles.

4. Subtipificación molecular de los aislamientos de *Salmonella* sp.

4.1. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de *Salmonella* sp. mediante ERIC-PCR.

En este punto se incluyeron los 204 aislamientos de SG. Además, se incluyó la cepa vacunal de SG obtenida de la vacuna comercial de SG 9R (Intervet).

Considerando el 100 % de similitud, la técnica de ERIC-PCR dio lugar a la formación de 11 *clusters* y 8 patrones fueron únicos. El grado de semejanza entre las cepas se representó en un dendrograma de homología (Figura 30). Al realizar el análisis en base a cada tipo de *cluster* y la cantidad de bandas presentes en el producto de amplificación, se observó que a las provincias de Entre Ríos y Santa Fe le correspondieron 10 de los 11 *clusters*. Ambas provincias tuvieron aislamientos en los siguientes *clusters*: II (con 5 bandas entre 180-480 pb), III (con 4 bandas entre 180-380 pb), IV (con 3 bandas entre 180-390 pb), V (con 6 bandas entre 180-410 pb), VI (con 5 bandas entre 180-390 pb), VII (con 7 bandas entre 200-900 pb), VIII (con 8 bandas entre 200-900 pb), X (con 9 bandas entre 200-900 pb) y XI (con 10 bandas entre 200-900 pb). El *cluster* IX (con 6 bandas entre 200-900 pb) le correspondió a la provincia de Entre Ríos mientras que el I (con 4 bandas entre 180-900 pb) le correspondió a la provincia de Santa Fe.

El *cluster* III se conformó con aislamientos de SG pertenecientes a 5 de las 6 provincias incluidas en este estudio, donde 5 aislamientos correspondieron a Santa Fe, 3 a Tucumán, 1 a Buenos Aires, 1 a Jujuy y 54 a Entre Ríos. Según estos resultados, el *cluster* III fue el predominante a nivel país y el que estuvo formado por el mayor número de cepas (64 cepas; 31,4 % de las cepas ensayadas). Los aislamientos de la provincia de Mendoza se agruparon en 5 *clusters* distintos, los cuales fueron V (1), VI (1), VII (2), X (1) y XI (1). Con respecto a la provincia de Jujuy, además de presentar 1 aislamiento en el *cluster* III, se observó que el otro aislamiento perteneció al *cluster* VI. Por otro lado, con respecto a Tucumán, 1 aislamiento perteneció al *cluster* V y 2 aislamientos al VIII. El patrón molecular generado por la cepa vacunal 9R tuvo 100 % de similitud con aislamientos de SG pertenecientes a las provincias de Entre Ríos (4), Santa Fe (1) y Mendoza (1), conformando el *cluster* XI. Con respecto a los patrones únicos, los mismos pertenecieron a las provincias de Entre Ríos (5 aislamientos) y Santa Fe (3 aislamientos).

Teniendo en cuenta el mismo año de aislamiento y los patrones que incluyeron a 2 o más provincias, 6 *clusters* presentaron dichas condiciones. Además, se pudieron aislar clones con el mismo patrón a través de distintos años. Por otro lado, se observa una tendencia de la persistencia en el tiempo de los clones a nivel país. Al *cluster* I sólo le correspondieron

aislamientos de la provincia de Santa Fe del año 2015 (2) pertenecientes al mismo galpón. Los aislamientos del *cluster* II fueron durante los años 2014, 2015 y 2016 correspondientes a las provincias de Santa Fe (5) y Entre Ríos (35). Con respecto a los aislamientos correspondientes a Santa Fe, 3 y 2 pertenecieron al galpón 7 y 8, respectivamente. Con respecto a los aislamientos de Entre Ríos, los mismos correspondieron a los galpones 3 (1), 4 (1), 6 (3), 9 (5), 10 (9), 11 (2), 13 (1), 14 (5), 17 (6) y 18 (2). El *cluster* III estuvo conformado por cepas obtenidas en Entre Ríos (4 cepas) en el 2014; Santa Fe (5 cepas), Tucumán (1) y Entre Ríos (21) en 2015; y Tucumán (2), Buenos Aires (1), Jujuy (1) y Entre Ríos (29) en el año 2016. Los aislamientos de la provincia de Santa Fe pertenecieron a los galpones 7 y 8, mientras que los de la provincia de Entre Ríos correspondieron a los galpones 4 (2014), 6 (2015), 9 (2015), 10 (2015), 11 (2015), 12 (2015), 14 (2015), 18 (2015), 19 (2016) y 20 (2016).

Los aislamientos pertenecientes al *cluster* IV fueron en 2013 y 2014, siendo aislamientos de las provincias de Santa Fe (1, galpón 2) y Entre Ríos (4, galpón 1). El *cluster* V incluyó aislamientos de las provincias de Mendoza (1), Tucumán (1), Santa Fe (1, galpón 8) y Entre Ríos (25) correspondientes a los años 2015 y 2016. Los aislamientos de la provincia de Entre Ríos correspondieron a los galpones 9 (2015), 11 (2015), 12 (2015), 13 (2015), 14 (2015), 17 (2016) y 18 (2016). El *cluster* VI incluyó aislamientos de SG provenientes de las provincias de Jujuy (1), Mendoza (1), Santa Fe (6) y Entre Ríos (6), donde los años de aislamientos correspondieron a 2013 (3 de Entre Ríos, galpón 1), 2014 (Santa Fe, galpón 2), y 2016 (Jujuy, Mendoza y 3 de Entre Ríos) correspondientes a aislamientos del muestreo pasivo.

Los aislamientos pertenecientes al *cluster* VII se aislaron en los años 2014 un total de 8 aislamientos de Entre Ríos (galpón 3) y 1 de Santa Fe (galpón 2) y 2015 de los cuales 2 correspondieron a Mendoza, 2 de Tucumán, 3 de Santa Fe (galpón 8) y 7 de Entre Ríos (galpón 3 y 12). Por otro lado, los aislamientos del *cluster* VIII correspondieron a los años 2015 (Santa Fe, 3 del galpón 8) y 2016 (Entre Ríos, 3 del galpón 18). El *cluster* IX sólo presentó aislamientos de la provincia de Entre Ríos correspondientes al año 2013 (3) provenientes de galpón 1. En el *cluster* X los años de aislamiento correspondieron al 2014 (Santa Fe) y 2015 (Entre Ríos y Mendoza) todos provenientes del muestreo pasivo. Por otro lado, en el *cluster* XI los años de aislamiento fueron 2014 (1 de Entre Ríos y 1 de Santa Fe), 2015 (1 de Santa Fe y 1 de Mendoza) y 2016 (2 de Entre Ríos, galpón 17).

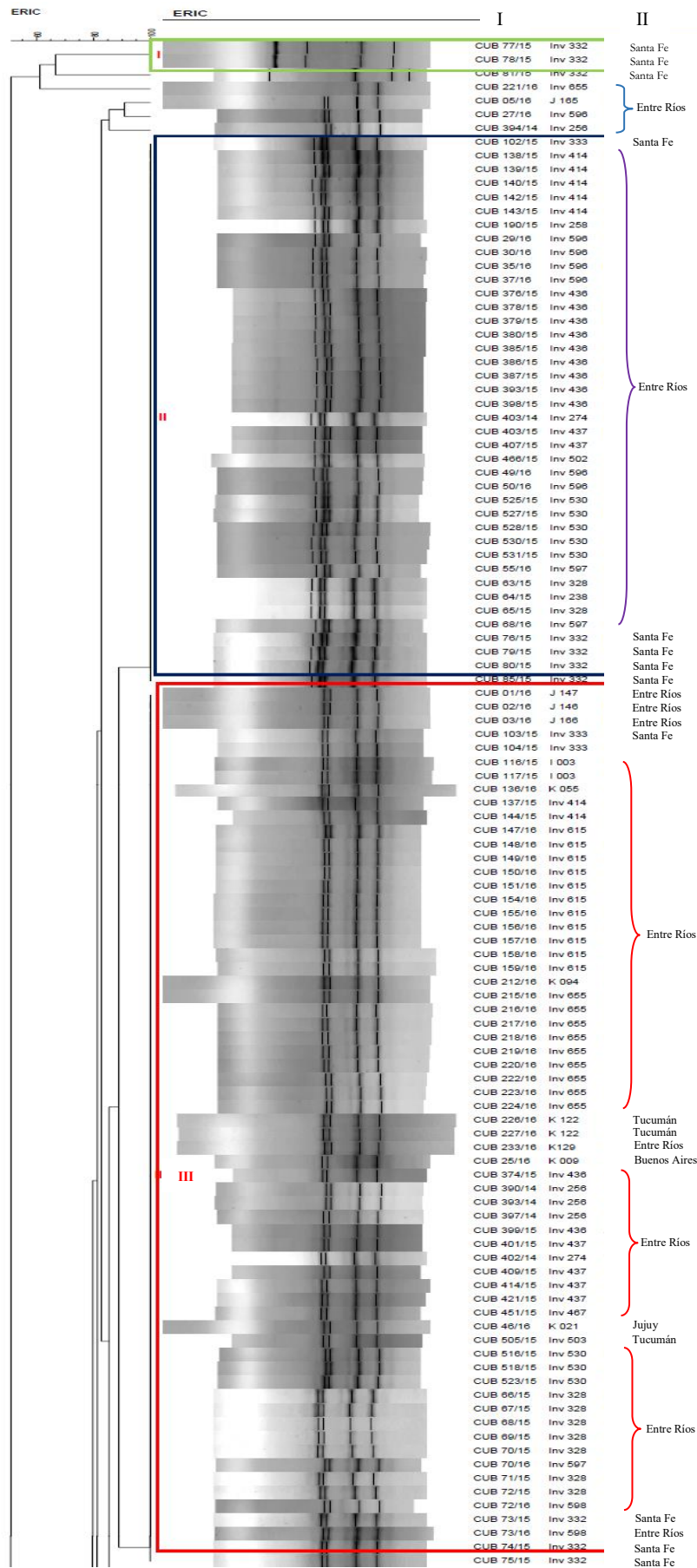
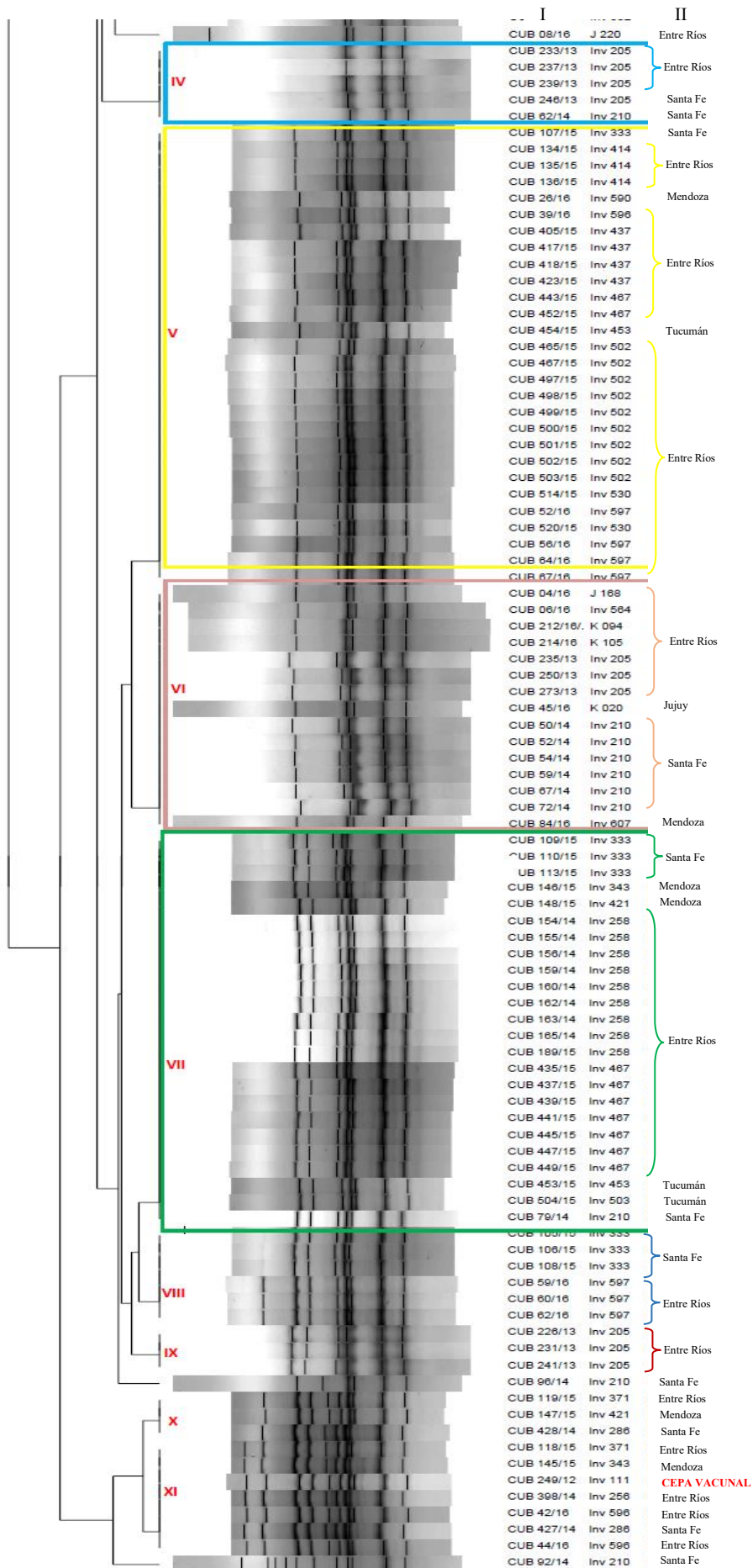


Figura 30. Dendrograma de la relación genética entre aislamientos de SG POR ERIC-PCR. I: Año del aislamiento II: Provincia argentina



Continuación de Figura 30. I: Año del aislamiento II: Provincia argentina

4.2. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de *Salmonella* sp. mediante PFGE.

Para este punto se incluyeron un total de 48 aislamientos de SG de los 204 aislamientos a los que se les había realizado ERIC-PCR (Tabla 36). Además, se incluyó la cepa vacunal 9R (Intervet) al estudio. Por otro lado, se incluyeron 6 aislamientos de *Salmonella* móvil aisladas de galpones de aves de postura con antecedentes de TA y 7 aislamientos de *Salmonella* móvil provenientes de pacientes humanos (Tabla 37). Las serovariedades móviles incluidas en el estudio correspondieron a aquellas aisladas de galpones y pacientes del mismo período de estudio: *S.* ser. Livingstone, SE y *S.* ser. Schwarzengrund.

Tabla 36. Aislamientos de *S.* ser. Gallinarum biovar Gallinarum incluidas en la reacción de PFGE.

Nº	Provincia	Año de aislamiento	Origen	Perfil de resistencia
1	Entre Ríos	2014	Ciego 10 AA	NA-S-E
2	Entre Ríos	2016	Hígado 9 AA	NA-CIP-E
3	Entre Ríos	2016	Pool Folículos AA	CTX-NA-E
4	Entre Ríos	2015	Hisopado Cloacal AA	NA-CIP-E
5	Entre Ríos	2014	Pata 3 AA	NA-ENR-S-E
6	Entre Ríos	2014	Hígado 2 AA	NA-S-E
7	Entre Ríos	2016	Hígado 5	CTX -NA-CIP-NOR-E
8	Entre Ríos	2016	Pool Hígado/Bazo	CTX-CAZ-CPD-NA-CIP-NOR-ENR-E
9	Entre Ríos	2016	Hígado 2	CPD-NA-CIP-NOR-E
10	Santa Fe	2015	Bazo 1	NA-E
11	Santa Fe	2015	Sangre 8	NA-E
12	Entre Ríos	2015	Médula ósea 3	NA-ENR-E
13	Mendoza	2015	Pata 1 Galpón 3	NA-DO-TE-S-E
14	Entre Ríos	2016	Hígado 1 AA	NA-E
15	Entre Ríos	2016	Hígado 1 AM	NA-CIP-E
16	Entre Ríos	2016	Cascara 2	NA-E
17	Entre Ríos	2013	Hígado 10	NA-CIP-NOR-S-E
18	Tucumán	2016	Pata 6	NA-CIP-E
19	B. Aires	2016	Pata 8	NA-CIP-ENR-E
20	Entre Ríos	2013	Alimento 2A	NA-CIP-NOR-ENR-E
21	Entre Ríos	2016	Bazo 4 AA	CTX-CAZ-NA-CIP-NOR-E
22	Entre Ríos	2015	Bazo 7 AA	KF-FOX-CTX-CAZ-CPD-NA-CIP-NOR-ENR-FFC-E
23	Entre Ríos	2015	Pata 4 AM	CFM-CTX-CPD-NA-CIP-NOR-ENR-FFC-E
24	Entre Ríos	2014	Yema 1	NA-NOR-E
25	Entre Ríos	2015	Ciego 5 AA	CFM-CTX-CAZ-CPD-NA-CIP-NOR-

ENR-FFC-S-E				
26	Entre Rios	2015	Higado 3 AM	CTX-NA-CIP-NOR-FFC-S-E
27	Santa Fe	2014	Pata 3	NA-E
28	Santa Fe	2014	Pata 1	NA-E
29	Entre Rios	2015	Hígado 3 AM	CTX-NA-CIP-NOR-ENR-FFC-S-E
30	Entre Rios	2015	Pool Folículo 1 AM	CAZ-NA-CIP-NOR-ENR-FFC-E
31	Jujuy	2016	Pata 1	AML-AMP-NA-CIP-DO-TE-CN-K-N-E
32	Jujuy	2016	Pata 4	NA-CIP-ENR-DO-TE-E
33	Entre Rios	2015	Ciego 10 AM	NA-CIP-NOR-ENR-S-E
34	Entre Rios	2016	Pool Ovario AA	CTX-CAZ-NA-CIP-NOR-ENR-E
35	Entre Rios	2015	Pata 9 AM	NA-CIP-NOR-FFC-S-E
36	Tucumán	2015	Pata 2	NA-E
37	Entre Rios	2015	Bazo 1 AA	CTX-CPD-NA-CIP-NOR-ENR-FOS-E
38	Entre Rios	2015	Pata 1 AM	CFM-NA-CIP-NOR-ENR-E-AZM
39	Entre Rios	2015	Pool Folículo	NA-CIP-NOR-ENR-FOS-E
40	Entre Rios	2016	Bazo 3 AM	NA-CIP-NOR-E
41	Entre Rios	2015	Bazo 2 AM	NA-E
42	Entre Rios	2016	Pata 2 AM	NA-NOR-E
43	Santa Fe	2014	Higado 2 SD AM	NA-NOR-S-E
44	Entre Rios	2015	Pata 1 AM	NA-CIP-NOR-E
45	Santa Fe	2015	Ciego 7	NA-S-E
46	Mendoza	2016	Pata 1	NA-DO-TE-S-E
47	Santa Fe	2015	Hisopado cloacal 10	NA-E
48	Santa Fe	2014	Ciego 7 AM	KF-FOX-CFM-CTX-CAZ-CPD-NA-DO-TE-AK-S-N-E

Referencias: **AML:** Amoxicilina; **AMP:** Ampicilina; **KF:** Cefalotina; **FOX:** Cefoxitima; **CFM:** Cefixima; **CTX:** Cefotaxima; **CAZ:** Ceftazidima; **CPD:** Cefpodoxima; **IMP:** Imipenem; **AMC:** Amoxicilina/Ácido clavulánico; **NA:** Ácido nalidíxico; **CIP:** Ciprofloxacina; **NOR:** Norfloxacina; **ENR:** Enrofloxacin; **DO:** Doxiciclina; **TE:** Tetraciclina; **C:** Cloranfenicol; **FFC:** Florfenicol; **AK:** Amicacina; **S:** Estreptomina; **CN:** Gentamicina; **K:** Kanamicina; **N:** Neomicina; **SXT:** Sulfametoxazol/Trimetoprima; **TGC:** Tigeciclina; **CT:** Colistina; **FOS:** Fosfomicina; **E:** Eritromicina; **AZM:** Azitromicina.

Tabla 37. Aislamientos de *Salmonella* sp. móviles incluidas en la reacción de PFGE.

Nº	Provincia	Año de aislamiento	Origen	Serovar	Perfil de resistencia
1		2014	Ponedoras		S-FOS-E
2					NA-E
3					AMP-NA-K-E
4		2015	Humanos	<i>S. ser. Schwarzengrund</i>	NA-E
5					NA-ENR-K-E
6					NA-ENR-E
7	Entre Ríos	2015	Ponedoras		E
8		2014			E
9		2017	Humanos	<i>S. ser. Enteritidis</i>	AML-AMP-DO-TE-C-FFC-FOS-E
10					S-E
11		2015			E
12			Ponedoras	<i>S. ser. Livingstone</i>	E
13		2016			E

Referencias: **AML:** Amoxicilina; **AMP:** Ampicilina; **NA:** Ácido nalidíxico; **ENR:** Enrofloxacin; **DO:** Doxiciclina; **TE:** Tetraciclina; **C:** Cloranfenicol; **FFC:** Florfenicol; **S:** Estreptomina; **K:** Kanamicina; **FOS:** Fosfomicina; **E:** Eritromicina; **AZM:** Azitromicina.

Al realizar la reacción de PFGE, el grado de semejanza entre las cepas se representó en un dendrograma de homología (Figura 31). Considerando el 100 % de similitud, se observó que la cepa de SG 9R presentó un patrón único. Con respecto a los 48 aislamientos de SG se observaron 4 patrones. El *cluster* I incluyó 3 aislamientos de la provincia de Entre Ríos aislados en los años 2015 (1) y 2016 (2). Con respecto al *cluster* II, el mismo incluyó los aislamientos correspondientes al año 2014 provenientes de la provincia de Entre Ríos. El *cluster* más prevalente fue el III, el cual incluyó 42 aislamientos pertenecientes a las provincias de Buenos Aires (1), Entre Ríos (27), Jujuy (2), Mendoza (2) y Santa Fe (8) correspondientes a los años 2013, 2014, 2015 y 2016. Un solo aislamiento de Entre Ríos correspondiente al año 2015 presentó un patrón único.

Teniendo en cuenta los perfiles de resistencia de los aislamientos de SG incluidos en el ensayo de PFGE, se observó que las cepas pertenecientes al *cluster* I fueron resistentes a 3 categorías de ATM (cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósido). Los aislamientos pertenecientes al *cluster* II, presentaron 3 patrones de resistencias; NA-S-E; NA-CIP-E y CTX-NA-EAl analizar el *cluster* más prevalente, se observaron aislamientos resistentes desde 2 a 13 familias de ATM. Por otro lado, el aislamiento con el patrón único presentó el perfil de resistencia NA-CIP-E.

Con respecto a los aislamientos de tipo móvil y considerando el 100 % de similitud (Figura 27), se observó que los aislamientos de SE (1 de granja y 2 de humanos)

presentaron el mismo patrón de restricción. Con respecto a *S. ser. Livingstone*, el ADN de uno de los aislamientos proveniente de galpones con antecedentes de TA se lisó y por lo tanto no se pudo obtener el patrón genético correspondiente, pero los aislamientos de los años 2015 (1) y 2016 (2) todos presentaron el mismo patrón de restricción. Por el contrario, con respecto a *S. ser. Schwarzengrund*, se observó que el aislamiento proveniente de un galpón de aves de postura con antecedente de TA presentó un patrón único, mientras que los 5 aislamientos provenientes de pacientes humanos conformaron un mismo *cluster*.

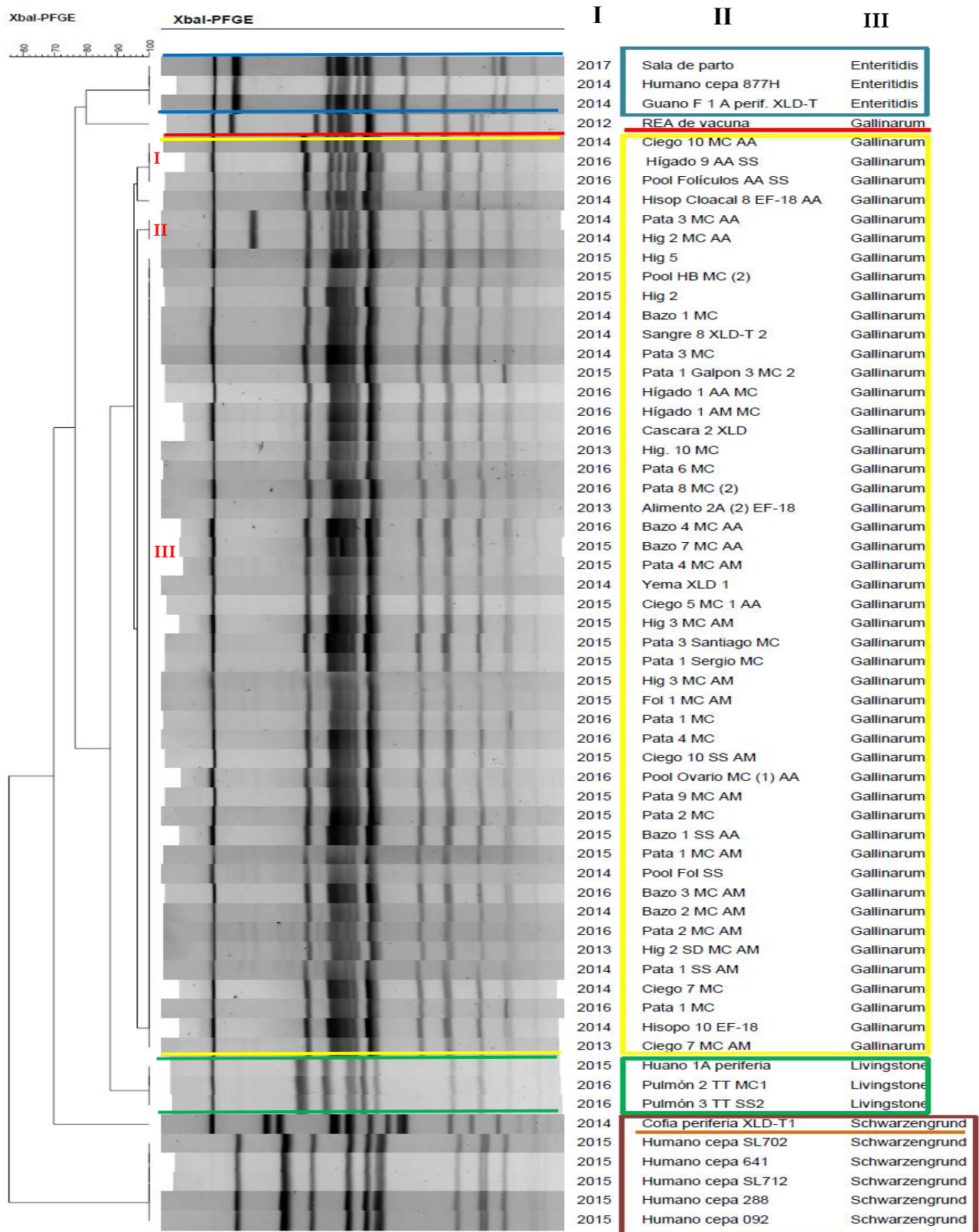


Figura 31. Dendrograma de la relación genética entre aislamientos de SG (amarillo) y *Salmonella* móviles. Subrayado en rojo cepa vacunal SG 9R. I: año de aislamiento. II: origen del aislamiento III: Serovariedad o biovar de *Salmonella*.

Discusión

1. Aislamiento de *Salmonella* sp.

Si bien SG 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. (Barrow y Freitas Neto, 2011). Un método de detección no ofrece la misma posibilidad de aislamiento a todos los serotipos de *Salmonella* (Jones y Richardson, 2004). Soria y col. (2011) demostraron que las cepas de SG y SP son difíciles de detectar en muestras de alimentos para aves. Por otro lado, un estudio posterior de Soria y col. (2013b) donde se compararon 3 métodos de cultivos para SG y SP en alimento inoculado artificialmente, observaron que el límite de detección usando caldo Salmocyst como pre-enriquecimiento, suplemento selectivo en tabletas para el caldo Salmocyst y siembra en agares XLDT y EF-18 estuvo entre 3×10^1 y 3×10^7 UFC/25 g. En este trabajo de tesis, teniendo en cuenta que se utilizó la misma matriz y metodología, sólo se obtuvieron 2 muestras de alimento positivas a SG. Con ello, se pudo constatar que el alimento puede servir como vía de entrada de esta bacteria, como plantean otros trabajos (Williams, 1981; Shivaprasad, 2000; Jones, 2011).

Para disminuir la carga bacteriana presente en el alimento para aves, generalmente se lo trata mediante un proceso de calentamiento. Por esta razón, si hay *Salmonella* presente, probablemente se dañaría por las altas temperaturas y para poder revivirlas se realiza previamente un enriquecimiento. Por lo antes mencionado, el resultado obtenido en las muestras de alimento en este trabajo de tesis podría explicarse de dos maneras: que la cantidad de SG presente en el alimento estaba por debajo del límite de detección para la técnica empleada o bien que el tratamiento térmico del alimento pudo dañar a las cepas de SG y no pudo ser recuperada después del enriquecimiento.

La recolección de los huevos durante el muestreo producidos en las granjas tiene la ventaja de ser una medida directa y con sentido epidemiológico de la sanidad del establecimiento avícola. Sin embargo, se ha observado que las gallinas naturalmente infectadas producen huevos contaminados en muy bajas frecuencias (Gast y Beard, 1993). Soria y col. (2012b) en su trabajo de inoculación de *Salmonella* en el contenido de huevo observaron que SG podía detectarse en una concentración entre 5 a 13 UFC/25 ml de muestra. Por otro lado, Soria (2012) en su estudio de *Salmonella* en huevos destinados para consumo humano, de un total de 451 pooles de clara y yema, sólo el contenido de 1 huevo fue positivo para este biovar. Betancor y col. (2010), en su trabajo de prevalencia de *Salmonella* enterica en aves y huevos del Uruguay, sobre un total de 620 pooles de huevos muestreados en granjas de postura, encontraron 4 muestras positivas a SG

correspondiendo a 4 granjas diferentes. Si bien los trabajos anteriores no fueron realizados en granjas con antecedentes de brotes de TA, los resultados negativos en las muestras de huevo analizadas en este trabajo de tesis coinciden con la baja prevalencia encontrada en la literatura.

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. Kagambèga y col. (2013) evaluaron 350 muestras de guano donde el 55 % de las mismas resultaron positivas para *Salmonella* de tipo móvil. Además, existen varios trabajos en los cuales el porcentaje de aislamiento de *Salmonella* paratíficas varía entre un 11 % al 60 % en muestras de guano (Mølbak y col., 2006; Ishihara y col., 2009; Fashae y col., 2010; Fagbamila y col., 2017). En este trabajo de tesis el porcentaje de muestras positivas de materia fecal (guano) fue del 10,6 % (10/94) que correspondieron a 6 galpones muestreados. El-Tras y col. (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 *Salmonella*, ya que compensa la baja prevalencia de esta infección que usualmente se registra a nivel individual.

La mayoría de los serovares de *Salmonella* producen sulfuro de hidrógeno con la excepción de unos pocos (S. ser. Paratyphi A y S. ser. Choleraesuis) y además la mayoría no fermentan la lactosa. Estas importantes propiedades bioquímicas se han utilizado para desarrollar una variedad de medios selectivos y diferenciales para el cultivo, el aislamiento y la identificación de *Salmonella* (Jajere, 2019). Soria y col. (2011), compararon la sensibilidad del agar XLDT y el agar EF-18 en muestras de alimento para aves contaminadas artificialmente con serovares móviles e inmóviles de *Salmonella*, y no encontraron ninguna diferencia en este parámetro. Sin embargo, por otro lado, Soria y col. (2017) encontraron que el agar EF-18 tenía una mejor sensibilidad relativa que el agar XLDT en muestras de alimento contaminado naturalmente. En el presente trabajo se observó que tanto EF-18 como XLDT tuvieron la misma Ser para el alimento, aunque, existió un bajo porcentaje de aislamiento de *Salmonella* sp. Esto concuerda con lo publicado por Poppe y col. (2004) quienes indicaron que las cepas inmóviles de *Salmonella* representan menos del 1 % de los aislamientos efectuados a partir de alimento balanceado para consumo animal.

En este trabajo de tesis también se aisló SG de muestras de órganos provenientes de aves agónicas sacrificadas. Chiroma y col. (2017) aislaron SG del hígado, bazo y ovario en aves de postura infectadas experimentalmente, desde los 9 días posteriores a la infección y durante todo el período experimental (42 días). Resultados similares fueron observados por Lopes y col. (2016), quienes recuperaron SG de los hígados y bazos a los 2, 4, 6 y 12 días después de la infección. En nuestro estudio, menos del 37 % de las muestras de órganos fueron positivas para el aislamiento de SG en las aves agónicas sacrificadas provenientes de galpones con antecedente de brote de TA. El bazo, el hígado, el contenido de folículos ováricos y la médula ósea fueron las muestras que mostraron la mayor tasa de aislamiento de SG, con una concordancia de ligera a buena entre ellas. Diferentes trabajos en los que se realizaron infecciones experimentales de SG (por ruta oral, intra-inguinal e intraperitoneal), mostraron una tasa de aislamiento de esta bacteria entre 0 % y 78 % en muestras de hígado, folículo ovárico/oviducto y bazo de gallinas ponedoras sacrificadas. Sin embargo, pudo ser aislada de todas las muestras de órganos sembradas de las aves muertas (Chacana y Terzolo, 2006; Prosdocimo, 2013; Nazir y col., 2014).

A diferencia de los resultados obtenidos por Prosdocimo (2013), donde no se pudo aislar SG de ninguna muestra de médula ósea, de las aves de postura infectadas experimentalmente con este biovar, en este trabajo de tesis el porcentaje de aislamiento de SG de médula ósea fue de 31,2 % (34/109). Esto podría explicarse a que las aves de postura infectadas experimentalmente no murieron de tifosis aviar en su fase septicémica, sino que fueron sacrificadas previo a que esto ocurra (Prosdocimo, 2013).

En un estudio realizado por Chacana y Terzolo (2006) se encontró que SG podía ser recuperado al segundo día después de la infección, utilizando hisopados cloacales, pero pasado ese tiempo no podía aislarse de ninguna de las muestras analizadas, incluso en todas las gallinas no vacunadas contra Salmonella. Estos resultados podrían explicar la baja tasa de aislamiento de SG obtenida en este trabajo de tesis.

Se sabe que SG crece bien en cultivos puros en medios no selectivos, pero se han descrito algunos medios selectivos y de enriquecimiento que contienen sustancias para inhibir el crecimiento de organismos contaminantes (OIE, 2018). Cuando se evaluaron los medios agarizados selectivos y diferenciales en las muestras de órganos provenientes de aves muertas naturalmente, en general presentaron una buena Ser y EXAr, salvo en las muestras del pool de ciegos donde el medio SS presentó una Ser de 0. Cox y col. (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. Por otro lado, Soria (2013) encontró una elevada Ser y EXAr en el aislamiento de SG utilizando los agares MC y SS de muestras de aves. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con estos autores. Con respecto a las muestras de médula ósea, Soria (2013) encontró una mayor Ser en agar MC comparado con el SS, atribuyéndole estos resultados a la menor selectividad del medio. En contraste, en este trabajo de tesis para el mismo tipo de muestra, la Ser y EXAr estuvo entre 0,98-1 y no fueron estadísticamente diferente los medios MC y SS.

Soria (2013) utilizando los medios selectivos y diferenciales como MC y SS y el método de impresión de los órganos, reportó que la concordancia entre estos medios estuvo entre muy buena y excelente para el aislamiento de SG en muestras de hígado, bazo y médula ósea, mientras que este parámetro fue excelente en el pool de 10 hisopados cloacales en los medios agarizados XLDT y EF-18 en aves de postura muertas naturalmente, utilizando el método de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo y siembra en medios selectivos y diferenciales. En este trabajo de tesis, se encontraron los mismos resultados con relación a los medios MC/SS, pero fueron diferentes para las muestras de hisopado cloacal en los medios agarizados XLDT y EF-18. Aunque Soria (2013) utilizó los mismos medios para el aislamiento de Salmonella del hisopado cloacal, la diferencia radica en que en el trabajo antes mencionado las muestras se procesaron en formato de pooles, mientras que en este trabajo se utilizaron muestras individuales.

2. Parámetros hematológicos y bioquímicos de aves agónicas de galpones con antecedentes de TA.

Lucas y Jamroz (1961) dijeron que el número deseable de aves para ser utilizado en un grupo experimental está determinado por el componente sanguíneo. Ellos informaron una alta variabilidad en algunos de los componentes de la sangre que, por razones prácticas, hacen que sea necesario aceptar un alto coeficiente de variación. En este trabajo de tesis, los rangos de todos los parámetros analizados en aves de postura provenientes de galpones con antecedentes de TA concuerdan con lo expresado por Lucas y Jamroz (1961). Nazir y col. (2013) mostraron que el aumento de RTGB se debió al aumento en el número de heterófilos y linfocitos en la infección experimental por SG. Sin embargo, los heterófilos contribuyeron más al desarrollo de la leucocitosis. En este trabajo de tesis, los heterófilos y los linfocitos fueron las células granulocíticas y mononucleares más comúnmente encontradas en los frotis sanguíneos, como ocurre en aves de postura y

pollos parrilleros clínicamente sanos (Lucas y Jamroz, 1961, Sturkie y Griminger, 1986, Simaraks y col, 2004, Latimer y Bienzle, 2010). El porcentaje de heterófilos y el RTGB aumentó en las aves de postura positivas al aislamiento de SG, mientras que el porcentaje de linfocitos disminuyó en los mismos animales. El aumento en el recuento de leucocitos podría deberse a la rápida multiplicación de SG dentro de los fagocitos (Berchieri, 2000). Diversos trabajos informaron que, durante las infecciones causadas por SG, una variedad de células inflamatorias se activa, lo que lleva a matar las bacterias (Kaiser y col., 2000; Chappell y col., 2009), y los heterófilos son la principal línea celular que responden en las infecciones bacterianas (Latimer y Bienzle, 2010).

Por otro lado, el hígado es responsable de la mayoría de los procesos de síntesis, metabolismo, excreción y desintoxicación en el cuerpo (Zaefarian y col., 2019). Algunas de las actividades enzimáticas que aumentan cuando hay una enfermedad hepática son ALT, AST y GGT (Tennant y Center, 2008). Sin embargo, en numerosos trabajos se informó que estas enzimas no son exclusivamente hepáticas (Campbell y Coles, 1989; Brugere-Picoux y col., 1987; Tennant y Center, 2008). Biazus y col. (2017) encontraron un incremento de los niveles enzimáticos de ALT, AST y GGT en aves de postura de la misma edad infectadas naturalmente por SG. A estos datos, se suman los aportados por Freitas Netos y col. (2007) informando que el nivel de AST es significativamente mayor a los 5 días posterior a la infección experimental con SG en aves de postura. Mientras que otros autores (Nazir y col., 2013; Sharma y col., 2018) informaron que los niveles de ALT y AST disminuyen después de 21 días a la infección artificial con el mismo biovar, hasta los valores de los pollos controles. En este trabajo de tesis, los niveles de ALT, AST y GGT no cambiaron significativamente en aves de postura con aislamiento positivo a SG, aun cuando en los animales negativos al aislamiento de SG se observó un aumento de AST y GGT en aves menores de 18 meses de edad. Además, Soria y col. (2015) encontraron valores similares a los de este trabajo de tesis con respecto a AST en aves de postura comerciales con o sin infección natural por SG, utilizando ARP como diagnóstico en aves menores de 18 meses. Por el contrario, los niveles enzimáticos de ALT fueron más altos en las aves de granjas con antecedentes de TA comparadas con el grupo de aves de la misma edad estudiadas por Soria y col. (2015). Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta la ubicación de las enzimas hepáticas ya que la AST se encuentra dentro de las células de diversos órganos y tejidos como el hígado, el riñón, el músculo-esquelético y cardíaco, mientras que, la ALT se localiza predominantemente

(aunque no únicamente) en el hígado. Así, un aumento de ALT procederá casi siempre del hígado, indicando destrucción de las células hepáticas (Moreira y Garrido, 2015).

La relación AST/ALT sugiere ciertas condiciones en los seres humanos, por lo que en este trabajo de tesis se evaluó dicha relación en aves de postura. Esta proporción suele ser inferior a 1, en hepatitis virales humanas (Botros y Sikaris, 2013). La mayoría de las muestras de aves de postura mostraron una relación AST/ALT mayor a 1 en este trabajo de tesis. Además, Senanayake y col. (2015) informaron que la relación AST/ALT aumenta con la edad en los pollos parrilleros criados a 27 ° C, con suministro de alimento y agua a voluntad. Si bien en este trabajo de tesis se ha realizado en aves de postura con antecedentes de TA, se observó que la relación AST/ALT disminuyó con el aumento de la edad de las aves de postura cuando el aislamiento a SG fue positivo e inclusive la disminución fue significativa en muestras negativas al aislamiento de SG.

Diferentes autores mostraron que la proteína sérica total está influenciada por la edad, aumentando en aves de 16 a 17 meses de edad (Jones, 1987; Kaneko, 1997; Filipovic y col., 2007). Sin embargo, en este trabajo de tesis se encontró que las PT disminuyeron en las aves de postura de ≥ 18 meses de edad. Inclusive, las PT y GLOB disminuyeron en las aves de postura positivas al aislamiento de SG. Estos resultados podrían explicarse, como informaron otros autores, debido al daño hepático severo que resulta en la falla de la síntesis de la proteína plasmática (Nazir y col., 2013; Shah y col., 2013; Kumari y col., 2015; Biazus y col., 2017).

La presencia de LF tiene un valor limitado para discriminar entre patógenos que causan diarrea acuosa en seres humanos cuando la respuesta inflamatoria es leve. Los pacientes con patógenos diarreicos presumiblemente no inflamatorios pueden tener una respuesta inflamatoria leve con LF entre de 11-20 L/campo (Guerrant y col., 1992; Huicho y col., 1996, 1997). Por otro lado, diferentes autores (Henderson y col. 1999, Kaiser y col., 2000) sugieren que la entrada de SG no desencadena una fuerte respuesta inmune o inflamatoria. Tal mecanismo permitiría la entrada de este biovar sin producir daño intestinal. Del mismo modo, Soria y col. (2015) encontraron una pobre concordancia entre el suero diluido en la prueba de ARP para Salmonella y LF en un estudio de monitoreo en aves de postura. En este trabajo de tesis, la concordancia entre ARP con suero puro o diluido y los resultados de LF estuvo entre nula a ligera. Comparando las muestras en las pruebas ARP y LF, solo el 5,2 % y el 2,1 % de las aves de postura fueron positivas en ambas pruebas para sueros puros y diluidos, respectivamente. Además, la concordancia entre el aislamiento de SG de las muestras y la presencia de LF fue de nula a

ligera, con diferencia estadística entre ambos. Diferentes autores informaron una seroprevalencia de salmonelosis en gallinas ponedoras entre 14,1 % y 43,4 % (Islam y col., 2006, Akter y col., 2007, Hossain y col., 2010) con suero puro y 7,0 % con sueros diluidos (Soria y col., 2015), respectivamente. Esta variación puede explicarse debido a la variación geográfica, la metodología, el número de aves utilizadas y si el suero se diluyó o no. En este trabajo de tesis hubo un 46,7 % y un 23,7 % de muestras de suero positivas a la infección por SG en brotes de TA con sueros puros y diluidos, respectivamente. La prueba de ARP en algunos casos puede tener falsos positivos y para ello, los sueros de la prueba deben inactivarse calentándolos a 56 °C durante 30 minutos en un baño de agua o bien diluyendo los sueros (OIE, 2018). Estos dos procesos se realizaron en nuestro estudio. Por otro lado, la prueba de ARP para *Salmonella* puede detectar tanto SP o SG (Shivaprasad y Barrow, 2008), y puede subestimar la infección por otros serotipos de *Salmonella*. Otras serovariedades de *Salmonella* invasivas, como SE, pueden dar resultados falsos positivos en pruebas serológicas para SP-SG debido a que comparten el antígeno inmunodominante O-9, que genera inmunidad cruzada. Además, los animales que son serológicamente positivos pueden haber dejado de excretar *Salmonella* a pesar de que las concentraciones de inmunoglobulina circulante pueden permanecer altas, mientras que otros animales en la granja pueden estar infectados. Las aves serológicamente negativas pueden resultar de una infección reciente, causando excreción antes de que la producción de inmunoglobulina sea máxima, o infección con serotipos menos invasivos (OIE, 2018). En este trabajo de tesis, sólo se pudo aislar S. ser. Derby en una muestra de hisopado cloacal en las aves de postura provenientes de galpones con antecedentes de TA. Por su fórmula antigénica, este serovar no cruza en la respuesta inmune con SG. Por lo tanto, hay una baja posibilidad de tener reacción cruzada con SE o SP en estos animales.

En referencia al resultado de ARP (positivo y negativo) y la edad de las gallinas (menor a 18 meses), Soria y col. (2015) no encontraron diferencias estadísticamente diferentes en los parámetros hematológicos y bioquímicos estudiados. Por el contrario, en este trabajo de tesis se observó un incremento en el porcentaje de heterófilos, relación H/L, RTGB, GLOB y disminución del porcentaje de linfocitos en las aves < 18 meses de edad con resultado positivo a la ARP. Las diferencias observadas en este trabajo de tesis y los resultados obtenidos por Soria y col (2015) pueden deberse a que estos últimos realizaron un estudio de monitoreo para *Salmonella* utilizando el suero diluido 1/5, sin confirmación de la presencia de SG con el aislamiento mediante medios de cultivos.

3. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano presentes en muestras de galpones de aves de postura con antecedentes de tifosis aviar.

Vandenberge y col. (2012) determinaron la presencia de residuos de ATM (DO: doxiciclina) en el hígado y tejido muscular de pollos de engorde suplementados con alimento contaminado con DO, y reportaron que el hígado fue la muestra que presentó mayor concentración de residuos del ATM. Si bien en este trabajo de tesis no se contaminó artificialmente el alimento para aves, se observó que el crecimiento de BS ATCC 6633 fue inhibido por 2 muestras de alimento provenientes de 2 galpones, donde en uno de ellos se había utilizado ATM (oxitetraciclina, fosfomicina y enrofloxacina), mientras que en otro galpón en el que indicaron haber usado enrofloxacina, se observó el efecto inhibitorio del crecimiento solo para ST INTA 06/11.

Otro de los métodos más comunes y económicos para administrar ATM a diferentes tipos de aves es a través del agua de bebida. Proporciona una solución rentable, una administración segura y una distribución rápida a todas las aves en los estadios primarios de la enfermedad, y facilita la dosis o el cambio de medicamentos (Landoni y Ibarrellos, 2015). Además, debido a la baja calidad del agua en los países en desarrollo (dureza, presencia de diferentes iones, sustancias en suspensión, temperatura, etc.) los ATM se usan, en ciertos casos, en dosis más altas que la dosis indicada, con la esperanza de alcanzar la concentración óptima necesaria en los cuerpos de los animales tratados (Collel, 2006; Dosoky y col., 2015; Okocha y col., 2018). En este trabajo de tesis la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento en muestras de agua provenientes de galpones de aves de postura con antecedentes de TA fue en bajo porcentaje. Sólo una muestra de agua inhibió el crecimiento de las 4 cepas evaluadas y correspondió al galpón en el cual estaban utilizando enrofloxacina (ENR). Sumano López y Gutierrez Olvera (2000) indicaron que cuando una granja con problemas sanitarios se medica con ENR se hace por vía oral mediante el agua de bebida y, en contadas ocasiones, por medio del alimento. Si bien en este trabajo de tesis no nos indicaron la vía de administración del ATM, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron la presencia de residuos de sustancias antibacterianas en el galpón tratado con ENR tanto en las muestras de agua como de alimento.

Existen varios trabajos de investigación sobre la presencia de residuos de ATM en animales tratados en diferentes matrices (corazón, hígado, bazo, riñones, etc.), mediante diferentes técnicas (Amjad y col., 2005; Mehdizadeh y col., 2010; Amiri y col., 2014). Sattar y col. (2014) determinaron la presencia de diferentes antimicrobianos en 50 hígados

y observaron altas concentraciones de tetraciclina (48 %), ciprofloxacina (44 %), amoxicilina (42 %) y residuos de ENR (40 %) en hígados de pollos y aves de postura mediante técnica de cromatografía en capa delgada. Si bien, en este trabajo de tesis se utilizó un método cualitativo, se observó un bajo porcentaje de muestras positivas de sustancias inhibidoras del crecimiento en las muestras de hígados y bazos provenientes de las aves agónicas sacrificadas. Si bien no se determinó el tipo de sustancia inhibidora, esas muestras correspondieron a galpones tratados con diferentes antibióticos como kanamicina, gentamicina, enrofloxacin y amoxicilina.

Las pruebas de inhibición del crecimiento microbiológico se han utilizado tradicionalmente en la detección de varios residuos de antibióticos. Estas pruebas se basan en la capacidad de los ATM para inhibir el crecimiento de bacterias sensibles. Una de las ventajas de estos ensayos es que son económicos y requieren un equipamiento simple. Por lo tanto, se pueden usar para el “screening” de grandes cantidades de muestras (Hagren y col., 2005). Soria (2012) evaluó la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento en huevos, provenientes de diferentes supermercados, mediante una técnica de inhibición microbiológica y reportó que las muestras de clara presentaron mayor efecto inhibitorio, y dicho efecto fue principalmente sobre SG. En contraste con esos resultados, en este trabajo de tesis se utilizaron las mismas cepas y método microbiológico, y se observó que el efecto de inhibición del crecimiento bacteriano fue dependiente de la serovariedad ensayada tanto en clara (SE INTA PT 1 y SG INTA 06/121) como en yema (ST INTA 06/11 y SP INTA 90/142). Los efectos de inhibición del crecimiento bacteriano presentes en el huevo también pueden deberse a la presencia de sustancias inhibidoras del mismo. De Franceschi y col. (1999) evaluaron el efecto inhibitorio de la clara y yema de huevo en un cultivo de SE y observaron que la clara inhibió la multiplicación de SE actuando como bactericida hasta los 7 días de postura y como bacteriostático hasta los 15 días de postura, mientras que en las muestras de yema no se observó dicho efecto. En este trabajo de tesis, a diferencia de lo reportado por De Franceschi y col. (1999), para SE INTA PT 1 la inhibición del crecimiento bacteriano fue dada con ambos componentes del huevo (clara y yema). Varios autores difieren en lo que respecta a que componente del huevo debe ser tomado en cuenta a la hora de evaluar residuos de sustancias antibacterianas. Anhalt (1977) y Hafez (1991) consideran a la yema como el principal compartimiento, mientras que Blom (1975) reporta mayor concentración de residuos en la clara. En este trabajo de tesis, se han evaluado ambos componentes y si bien se observó un mayor efecto de

inhibición del crecimiento bacteriano en las muestras de clara, dicho efecto también fue observado con las muestras de yema.

Gaudin y col. (2009) evaluaron la capacidad de detección de residuos de ATM del kit Explorer en muestras de huevo entero y observaron que se podían detectar residuos de eritromicina y tilosina, pero que no fue satisfactorio para la detección de tetraciclinas. A diferencia de estos autores, en este trabajo de tesis se evaluaron muestras de clara y yema por separado y se observó que no se pudieron detectar residuos de sustancias inhibitoras en muestras de yema, aunque sí en clara, pero en menor número que los obtenidos con el método microbiológico en placa. La menor tasa de detección de muestras positivas con el kit Explorer con respecto al método en placas, una de las causas podría deberse a que las muestras de huevo deben diluirse antes de realizar la prueba con el kit, mientras que en el método de placa se utilizó la muestra sin dilución.

Dado que los antimicrobianos no comparten una estructura química común, se necesitan diferentes procedimientos analíticos para detectar cada familia o incluso cada compuesto (Sanz y col., 2010). Diversos autores reportaron que cuando se administran por vía oral o intramuscular fluorquinolonas a gallinas ponedoras, sus residuos aparecen en los huevos aproximadamente 24 h después de la primera dosis y persisten tanto en la yema como en la albúmina durante varios días después de la interrupción del tratamiento (Maxwell y col., 1999; Lolo y col., 2005; Herranz y col., 2007). El método comercial Explorer permitió realizar un tamizaje de las muestras analizadas en este trabajo de tesis, de manera que en segundo lugar se utilizó el test para determinar residuos de quinolonas mediante el kit Equinox. Sanz y col. (2010) evaluaron el mismo kit en muestras de músculo (bovino, ovino, porcino y de aves) para diferentes quinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina, sarafloxacina, danofloxacina, difloxacina y flumequina) y observaron que las concentraciones que puede detectar el kit están por debajo de los límites permitidos, por lo que es una buena prueba para la detección de quinolonas. En este trabajo de tesis, si bien la matriz fue diferente (clara de huevo), se observó que el 63,4 % de las muestras positivas a sustancias antibacterianas presentaron residuos de quinolonas. De los 4 galpones que dijeron haber usado enrofloxacina, sólo en 2 de ellos se pudo detectar residuos de quinolonas como así también en 3 galpones que no indicaron el uso de este ATM. Cornejo y col. (2011) estudiaron la depleción de residuos de enrofloxacina y flumequina en aves de postura y reportaron que los residuos de enrofloxacina + ciprofloxacina en la clara de huevo fueron detectables hasta por 8 días, mientras que, en la yema de huevo las concentraciones de estos ATM fueron detectables

hasta el día 10 posterior a la administración. En este trabajo de tesis se preguntó si durante las últimas 3 semanas se habían utilizado ATM, el tiempo transcurrido entre el uso y la detección del residuo en el laboratorio pudo deberse a lo expuesto por Cornejo y col. (2011) y/o a que en los galpones positivos a quinolonas adquirieron el alimento para las aves y probablemente desconocían si este ATM había sido agregado en el momento de su preparación.

Aunque diversos autores sugieren que la muestra de elección para estudiar los residuos de enrofloxacin y otras fluorquinolonas (danofloxacin y sarafloxacin) en muestras de huevos es la yema (Gorla y col., 1997; Chu y col., 2002; Yang y col., 2007; Cornejo y col., 2011). Lolo y col. (2005) indicaron que tanto las muestras de clara y yema pueden ser útiles para detectar residuos de enrofloxacin + ciprofloxacina. Sin embargo, en este trabajo de tesis sólo se pudo detectar residuos de quinolonas en las muestras de clara, aunque no se ensayaron muestras de yema directamente, debido a que ninguna de esas muestras fue positivo a sustancias antibacterianas.

4. Identificación de factores de riesgo para *Salmonella* sp. en gallinas ponedoras con antecedentes de tifosis aviar.

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, la mera presencia del factor no tiene valor diagnóstico per se sobre la presencia de enfermedad individual (Tarabla, 2000). Uno de los factores que se determinó en este trabajo de tesis que puede afectar la presencia de *Salmonella* en las granjas analizadas es “si se realiza o no el control de moscas”. *Salmonella* se distribuye ampliamente en moscas y con menor frecuencia en escarabajos y ácaros. Las granjas ofrecen nichos excelentes y adecuados como estiércol, polvo, alimentos derramados y largos períodos de producción sin limpieza (Wales y col., 2009; Zamora-Sanabria y Molina Alvarado, 2017) para la reproducción de estos vectores. La *Musca domestica* es la mosca asociada con mayor frecuencia con zoonosis en todo el mundo (Bidawid y col., 1978; Barro y col., 2006). Hinckle y Hickle (1999) reportaron que las moscas son el grupo de plagas más importante en aves de postura de California. Además de la *Musca domestica*, indicaron que la especie *Fannia* es un problema para el vecindario porque puede migrar lejos de las granjas. En este trabajo de tesis no se determinó la especie de mosca presente en los galpones muestreados, pero sí se observó que las granjas que no realizaban control de este vector presentaban mayor probabilidad de tener SG en sus instalaciones. En contraste con estos

hallazgos, Soria (2013) no encontró como posible riesgo que las granjas presenten *Salmonella* sp. en base a si realizan o no el control de moscas, lo que podría deberse a que en este estudio el 85 % (17/20) de las granjas si realizaban control para este vector. Por otro lado, Vanselow y col. (2007) reportaron que las poblaciones de moscas fueron identificadas como un factor de riesgo para la excreción de *Salmonella* sp. por el ganado de engorde en Australia. Si bien este estudio fue realizado en otro tipo de producción, concuerdan con los resultados encontrados en este trabajo de tesis.

Otro factor de riesgo que se pudo determinar en este trabajo de tesis fue si en las granjas muestreadas “realizaban o no vacunación para SG”. La vacunación es una herramienta de control específica contra *Salmonella*. Las vacunas se usan para aumentar la resistencia a la infección y puede mejorar la capacidad de respuesta a corto plazo de los programas de control, pero los problemas no se eliminan por completo (Zamora-Sanabria y Molina Alvarado, 2017). La vacuna viva SG 9R contiene una cepa rugosa de SG. Tanto SG como SE pertenecen al serogrupo D1 de *Salmonella* y comparten la misma fórmula de antígeno somático "O" inmunodominante (Ochoa-Reparaz y col., 2004) y, por lo tanto, se espera una protección cruzada razonable entre los dos serotipos. Esta teoría se confirmó en un gran ensayo de campo, en los Países Bajos, en el que 80 lotes comerciales fueron vacunados con la cepa de la vacuna SG 9R y el nivel de aparición de infecciones por SE en los lotes fue del 2,5 % (2/80 lotes), que fue significativamente menor que en granjas no vacunadas (214 de 1854 aves, 11,5 %; Feberwee y col., 2001a). Si bien, en este trabajo de tesis se determinó que aquellas granjas que no vacunaban contra *Salmonella* sp. tenían más probabilidad de tener SG en sus instalaciones, todas las granjas que habían recibido la vacuna 30 % (6/20) en los galpones muestreados fueron positivos al aislamiento de SG en muestras de órganos de aves muertas. Esto sugiere que, las condiciones ambientales (estrés, mala higiene, etc.) y las malas prácticas de manejo pueden interferir con el éxito de la vacunación (Penha Filho y col., 2009). Por otro lado, de los 14 galpones no vacunados con SG 9R, solo en uno se aisló SE de guano. Este hallazgo podría explicar por qué en las granjas vacunadas no se aisló este último serovar.

Muchas de las variables relacionadas con la presencia de *Salmonella* sp. que han sido estudiadas en este trabajo de Tesis y que no resultaron significativas al realizar el análisis multivariado, fueron “número de galpones”, “equipamiento para el ingreso de personas”, “eliminación de cadáveres”, “análisis de agua”, “cantidad de aves en el galpón”, “cantidad de aves por jaula”, “edad de las aves” y “uso de medicación”.

Con respecto al número de aves por galpones, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, varios autores demostraron que lotes con un gran número de aves presentaban un aumento de riesgo de contaminarse con *Salmonella* que en aquellos que contenían menor cantidad de aves (Huneau-Salaün y col., 2009; Mollenhorst y col. (2005; USDA, 2000; Snow y col., 2010, Soria, 2013). Esta disparidad de resultados podría deberse al bajo número de galpones estudiados para este parámetro, ya que, si bien se obtuvo un P de 0,057 en el primer análisis y de esta manera se pudo incluir esta variable a el análisis multivariado, sin embargo, no fue un factor de riesgo asociado a la presencia de SG.

Por otro lado, Chaiba y Rhazi-Filali (2016) observaron que las granjas avícolas que utilizan agua de red, potable, tienen una menor prevalencia de *Salmonella*. Por otro lado, Argüello y col. (2013) informaron que el tratamiento del agua principalmente mediante la adición de ácidos orgánicos, reducen el número de *Salmonella*. Si bien en este trabajo de tesis no se preguntó la fuente de abastecimiento de agua, no se aisló *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas y por lo tanto no se identificó dicha variable como un factor de riesgo para la presencia de *Salmonella* sp.

Humprey y col. (1991a) demostraron mediante ensayos experimentales que la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* varía con la edad de las aves. Namata y col. (2008) identificaron que existe un mayor riesgo de contraer *Salmonella* a medida que las gallinas envejecen y aumenta el tamaño de las aves. Sin embargo, Soria (2013) no encontró la misma asociación de estos factores de riesgo con la infección por *Salmonella*. En este trabajo de tesis, el aislamiento de SG fue independiente tanto de la edad como de la cantidad de aves en el galpón, lo que podría explicar por qué no se considera esta variable como un posible factor de riesgo para este caso.

Mestorino (2009) indicó que existe un amplio espectro de agentes antimicrobianos que permiten enfrentarnos a las más diversas infecciones bacterianas asegurando la sanidad y el bienestar de los animales. Taddese y col. (2019) evaluaron los factores de riesgo de presencia de *Salmonella* sp. a través del aislamiento de la misma en gallinas ponedoras y huevos en la ciudad de Jimma, suroeste de Etiopía, y observaron que el uso previo de medicación en las aves no se identificó como factor de riesgo ($P > 0,05$). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con los resultados obtenido por estos autores.

5. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* sp.

En este trabajo de tesis, la susceptibilidad a los ATM en *Salmonella* dependió si los serovares eran móviles o inmóviles. El 100 % de los aislamientos fueron resistentes a la E. Las enterobacterias son intrínsecamente resistentes a la gran mayoría de los macrólidos en relación con la baja permeabilidad natural de los mismos a través de la membrana externa debido a su naturaleza hidrófoba (Vaara, 1993; Gomes y col., 2016). Datos reportados por otros autores (Taddele y col., 2012; Lee y col., 2013) informaron el mismo porcentaje de resistencia.

Con respecto a la categoría de las penicilinas en cepas de SG, diferentes autores reportaron sensibilidad intermedia y/o resistencia para los antibióticos AML y AMP (Sannat y col., 2017; Seo y col., 2019). En contraste con estos autores, en este trabajo de tesis los aislamientos de SG fueron sensibles a los mismos ATM. Por otro lado, con respecto a la categoría de los carbapenemes, Seo y col. (2019) reportaron sensibilidad para IMP, lo que concuerda con los resultados reportados en este trabajo de tesis.

Para la categoría de las tetraciclinas, diversos autores reportaron resistencia del 35 % a DO y a TE en cepas de SG (Mantilla y col., 2010; Taddele y col., 2012; Parvej y col., 2016). En contraste con estos autores, en este trabajo de tesis se observó que, para los mismos ATM, las cepas de SG presentaron una sensibilidad entre el 80 % y 98 %. Por otro lado, Lee y col. (2013) reportaron resultados similares de susceptibilidad a la TE en cepas de SG aisladas de huevo a los encontrados en esta tesis. Con respecto a la categoría de los aminoglucósidos, los resultados reportados por diferentes autores difieren en la susceptibilidad de SG a esta categoría de ATM. Taddele y col., (2012) reportaron aislamientos de SG sensibles a CN pero resistentes a K, mientras que Parvej y col. (2016) encontraron cepas resistentes a ambos. En este trabajo de tesis, además de evaluar la sensibilidad a CN y K, se evaluaron otros miembros de este grupo de ATM como ser N, y en todos se observó una sensibilidad mayor del 96%. Resultados similares fueron reportados por Lee y col. (2013).

Al evaluar la sensibilidad a los ATM de la categoría de las quinolonas, diversos autores encontraron una resistencia mayor al 95 % al AN (Kang y col., 2010; Sannat y col., 2017). Estos datos concuerdan con los encontrados en este trabajo de tesis donde el 100 % de las cepas presentaron resistencia al mismo ATM. Por otro lado, algunos autores (Soria, 2012; Lee y col., 2013) observaron en cepas de SG aisladas de contenido de huevo una sensibilidad del 100 % a las fluorquinolonas (CIP, NOR y ENR). Taddele y col. (2012) informaron un 88,8 % y 82,2 % de sensibilidad a CIP y ENR, respectivamente. Por

el contrario, Seo y col. (2019) informaron un 69,2 % de resistencia a CIP en cepas de SG aisladas de brotes de TA en Korea. En contraste con lo encontrado por estos autores, en este trabajo de tesis se observó una sensibilidad intermedia de 53 %, 24 % y 58 % de las cepas a CIP, NOR y ENR, respectivamente, además, en algunas de las granjas muestreadas informaron el uso de ENR durante el período de estudio.

Diferentes estudios (Oh y col., 2000; Lee y col. 2003) muestran que los datos MDR para las cepas de SG es variable (8,5 % - 84,4 %). En este trabajo de tesis, se observó que el 18,1 % (37/204) de las cepas de SG fueron clasificadas como cepas MDR, presentando resistencia a ATM de las categorías de las cefalosporinas, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, fenicoles, fosfomicina y macrólidos. Esto puede deberse a que en algunos de los galpones que se muestrearon indicaron haber usado ATM de las categorías antes mencionadas. A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, Oh y col., (2000) reportaron que el patrón de MDR contenía ATM de las categorías de los lipopeptidos, lincosamidas, penicilias y aminoglucósidos, mientras que Lee y col (2003) reportaron cepas MDR que contenía ATM de las categorías de las penicilinas, aminoglucósidos y tetraciclinas.

La administración de ATM es uno de los métodos para controlar los brotes de TA en granjas de aves de postura (Lee y col., 2003). Oh y col., (2000) y Lee y col., (2003) reportaron un incremento de cepas de SG MDR en brotes de TA en Korea debido al uso de los ATM para su control. A diferencia de estos autores, basado en los datos de la encuesta a los productores y los resultados de aislamiento de *Salmonella* spp., en este trabajo de tesis no se observó un incremento de cepas MDR en aquellas granjas que usaban ATM de las que no lo usaban.

Con respecto al índice RMAs, diversos autores reportaron valores mayores a 0,21 en cepas de *Salmonella* móviles aisladas de aves, productos avícolas y frigoríficos (Cloeckart and Schwarz, 2001; Bada-Alamedji y col., 2006; Elgroud y col., 2008; Dominguez, 2016; Vuthy y col., 2017; Cesur y col., 2019). En este trabajo de tesis, se observó que las cepas de *Salmonella* móviles aisladas de granjas de aves de postura con antecedentes de TA presentaron valores de RMAs más bajos (0,07 y 0,10). Por otro lado, con respecto a *S. ser. Schwarzengrund*, Domínguez (2016) reportó un índice de RMAs de 0,58 (resistentes a 14 de los 26 ATM evaluados) y *S. ser. Cerro* que fue sensible a todos los ATM. Sin embargo, en contraste por lo informado por este autor, en este trabajo el índice RMA para la *S. ser. Schwarzengrund* y *S. ser. Cerro* fue de 0,07 (resistentes a 2 de los 29 ATM evaluados) y un aislamiento de *S. ser. Schwarzengrund* tuvo un índice de RMAs de

0,10 (resistente a 3 de los 29 ATM evaluados). Krumperman (1983) indicó que valores de índices de MRAs por encima de 0,28 indica presencia de microorganismos multirresistentes. En este trabajo de tesis los índices de RMAs estuvieron por debajo de ese valor, por lo que no existe riesgo de presencia de cepas multirresistentes.

Elgroud y col. (2015) informaron que 7 cepas de ST provenientes de muestras de pacientes humanos de un hospital de Argelia el 43 % (3/4) fueron resistentes al AN y los 4 aislamientos restantes presentaron el patrón de resistencia AMP-C-S-Sulfonamida-TE (índice RMAs de 0,31). Wang y col. (2019) informaron, al comparar los patrones de resistencia obtenidos en humanos con los patrones de resistencia obtenidos de aislamientos de animales y carnes, que el patrón de resistencia más frecuente en ST fue el de AMP-S-Sulfonamida-TE y AMP-C-S-Sulfonamida-TE, este último patrón de resistencia concuerda con lo reportado por Elgroud y col. (2015). A diferencia de lo informado por estos autores, si bien en este trabajo de tesis el número de cepas provenientes de pacientes humanos fue menor (29 aislamientos) y que ST fue el serovar más prevalente (19/29), se observó que 12 aislamientos presentaron un patrón de resistencia AN-E y en 5 aislamientos se observó además resistencia a S (AN-E-S), K (AN-E-K) ENR (AN-E-ENR) y CFM (AN-E-CFM).

Muchos estudios de resistencia a ATM han revelado que *S. ser. Schwarzengrund* es MDR, especialmente a las fluoroquinolonas (Olsen y col., 2001; Tsai y Hsiang, 2005; Lauderdale y col., 2006; Zhao y col., 2006; Aarestrup et al., 2007). Los aislamientos de *S. ser. Schwarzengrund* provenientes de pacientes humanos incluidos en este trabajo de tesis (5 aislamientos) presentaron resistencia a AN. De igual manera aun con un número mayor de cepas analizadas, Chen y col. (2010) reportaron que los 30 aislamientos estudiados de *S. ser. Schwarzengrund* aisladas de pacientes humanos fueron resistentes al AN. Por otro lado, Olsen y col. (2001) en un estudio de un brote nosocomial de infección por *S. ser. Schwarzengrund*, todas las cepas presentaron resistencia a CIP y AN. Sin embargo, en este trabajo de tesis, los 5 aislamientos correspondientes al mismo serovar fueron resistentes al AN, pero sensibles a CIP.

Muchos serotipos de *Salmonella* fueron reportados por diversos autores como resistentes al SXT (Olsen y col., 2001; Chen y col., 2006; Lauderdale y col., 2006). En contraste con estos autores, en este trabajo de tesis todos los aislamientos (independientes de la serovariedad) fueron sensibles al SXT.

En este trabajo de tesis, en base a los resultados de los antibiogramas realizados en las cepas de *Salmonella* tipo móviles (de granjas y de humanos), existió diferencia en la tasa

de resistencia a los ATM en los aislamientos humanos y ambiente hospitalario con respecto a los aislamientos provenientes de las aves y su ambiente. Esto se presentó en los ATMs AML, AMP, K y NA. Una de las posibles causas a lo que se puede deber este comportamiento es a la diferencia de fuentes de infecciones entre los humanos y las aves de producción. (Wang y col., 2019).

La resistencia a las fluoroquinolonas en bacterias gramnegativas ha recibido atención en todo el mundo (Chen et al., 2010). Las cepas con alta CIM para la ciprofloxacina se han asociado con mutaciones puntuales en la región determinante resistente a las quinolonas (RDRQ) del gen *gyrA* que codifica la enzima ADN-girasa, que es el objetivo principal de la acción de las quinolonas (Pidcock, 2002; Giraud y col., 2006). Las mutaciones en un solo punto pueden ser suficientes para generar altos niveles de resistencia al AN. Aunque no evaluaron la sensibilidad a este último ATM, Lee y col. (2004), de 258 aislamientos de SG provenientes de diferentes años (1995 y 2001), observaron resistencia o sensibilidad disminuida (intermedia) a las ENR, CIP y NOR y fueron positivos al gen *gyrA*. Estos datos concuerdan con lo observado en este trabajo de tesis, ya que los aislamientos de SG fueron positivos al gen *gyrA* y los mismos presentaron sensibilidad disminuida a CIP, NOR, ENR, y presentaron un 100% de resistencia al AN. Se han reportado especies de *Salmonella* con altos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas, y se han estudiado mutaciones que confieren resistencia. Las mutaciones de un solo punto en la región RDRQ de *gyrA* confieren resistencia a las quinolonas como el AN (Lee y col., 2004). Estas mutaciones en el sitio objetivo muestran que diferentes mutaciones de aislamientos de *Salmonella* resistentes a fluoroquinolonas pueden dar lugar a niveles de resistencia muy diferentes de quinolonas, y esto no es lo mismo para todas las cepas y todas las mutaciones de resistencia. Por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos son inadecuadas para aclarar el nivel de resistencia a las quinolonas en *S. enterica* (Kongsoi y col., 2017). Sin embargo, queda por investigar en este trabajo de tesis cuál es el papel específico de estas mutaciones en la resistencia a la quinolona en los aislamientos de SG provenientes de galpones con antecedentes de TA.

Por otro lado, en este estudio no se detectó el gen de resistencia a quinolona mediados por plásmidos, *qnrB*, en las cepas de SG estudiadas. A diferencia de Seo y col. (2019) quienes confirmaron la presencia de este gen en aislamientos de SG aisladas de aves en Corea. Aunque los determinantes del gen *qnrB* confieren un bajo nivel de resistencia a las quinolonas por sí solo, facilitan la adquisición de resistencia de alto nivel y mutaciones de resistencia en cepas susceptibles (Yang et al., 2008). Sin embargo, en este trabajo de

tesis, en los aislamientos de *Salmonella* móviles provenientes de pacientes humanos, se observó que 18 aislamientos presentaron el gen *qnrB*. Veldman y col. (2011) reportaron salmonelas humanas positivas a plásmidos de multiresistencia a quinolonas (PMQR por sus siglas en inglés: Plasmid Mediated Quinolone Resistance) en *S. ser. Corvallis* (*qnrS1*) y ST (*qnrB19*). Además, reportaron el primer aislamiento de *Salmonella* sp. positiva a *qnrD*.

6. Determinación de la relación clonal de los aislamientos de *Salmonella* sp. mediante técnicas moleculares (ERIC-PCR y PFGE).

De Souza y col. (2015) analizaron 22 cepas de SG aisladas de aves de corral enfermas de diferentes regiones brasileñas durante un período de 27 años hasta 2014. Estos autores obtuvieron 3 clusters y 3 patrones únicos de ERIC para las cepas de SG, con un 80 % de similitud. En el presente trabajo de tesis, se ha utilizado la técnica de ERIC-PCR para caracterizar el perfil genético de un mayor número de aislamientos que los analizados por De Souza y col. (2015). De los 204 aislamientos de SG, aisladas en diferentes años y provincias de Argentina a partir de granjas con antecedentes de TA, y considerando una similitud más estricta (100%), el dendrograma generó 11 clusters y 8 patrones únicos.

Analizando las cepas de SG según el año del aislamiento, de Souza y col. (2015) observaron que las cepas aisladas en 2011 y en 2012 presentaron genotipos ERIC idénticos (100% homología) con una cepa de SG aislada en 1991 de aves infectadas. En este trabajo de tesis se observó que en el clusters III se encontraron el mayor número de aislamientos provenientes de 5 de las 6 provincias de Argentina incluidas en el estudio durante los años 2014, 2015 y 2016. Es poco probable que la propagación de SG a largas distancias ocurra naturalmente y, además, se cree que la transmisión horizontal es la principal ruta de propagación de SG (Berchieri Junior y col., 2001). Por lo tanto, la propagación del microorganismo a largas distancias geográficas no sería simple, sino que dependería del transporte activo de la bacteria. Una posibilidad podría ser el comercio no intencionado de animales enfermos de una región a otra, lo que lleva a la instalación de un brote local causado por un clon característico de otro estado (de Souza y col., 2015a). Esto podría explicar los resultados obtenidos con respecto a el clusters III de ERIC-PCR.

Las vacunas de cepas vivas rugosas (9R) originadas de cepas atenuadas 9S de SG están disponibles comercialmente (Okamoto y col., 2010). De Souza y col. (2015) incluyeron la cepa vacunal 9R en su estudio y observaron que presentaba un genotipo de ERIC muy diferente al de las cepas de campo, y debido a esta baja similitud, agrupaba por

separado de las demás. A diferencia de este autor, en el presente trabajo de tesis se observó que la cepa vacunal 9R compartió el clusters de ERIC-PCR (Clusters XI) con aislamientos de SG pertenecientes a las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Mendoza. Sin embargo, al realizar la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), en el dendrograma del PFGE obtenido en este trabajo de tesis se observó que la cepa vacunal presentó un clusters único, separado de los aislamientos de SG provenientes de brotes de TA. Resultados similares fueron reportados por Kwon y col. (2010), donde analizaron un total de 69 aislamientos de SG (aislados desde 2001 a 2007) y la cepa vacunal 9R, y observaron que la cepa de la vacuna (SG 9R) mostró notablemente un clusters diferente al de las cepas de SG, lo que indica que la cepa vacunal podría diferenciarse de las cepas de campo. Por otro lado, a diferencia de estos resultados, Van Inmmersel y col. (2013) observaron una estrecha relación entre las cepas SG 9R y SG aisladas de diferentes granjas en diferentes países de Europa. Sin embargo, lo que ellos proponen es que este método evidencia sólo pequeñas regiones del genoma microbiano y en base a sus resultados confirman el valor limitado de esta técnica para discriminar aislamientos estrechamente relacionados. Sin embargo, en este trabajo de tesis la técnica de PFGE permitió diferenciar la cepa vacunal de las cepas de los brotes de TA.

Con respecto a *S. ser. Schwarzengrund*, si bien solo se analizó un único aislamiento proveniente de granjas, se observó que presentó un patrón único diferenciado de los 3 aislamientos de este serovar provenientes de pacientes humanos. Estos datos concuerdan por lo reportado por Tejada y col. (2016), donde ellos no encontraron relación clonal entre los aislamientos de pacientes humanos con los de los aislamientos provenientes de granjas. A diferencia de estos resultados, Aarestrup y col. (2007), utilizando PFGE para la detección de clones de *S. ser. Schwarzengrund* en productos de pollo y aislamientos humanos, demostraron que había relación clonal entre este microorganismo proveniente de los alimentos con el hombre. El hecho de que se observaron algunos patrones dentro de un serotipo particular en *Salmonella* humana pero no en *Salmonella* aisladas de granja y viceversa demuestra la utilidad de subtipificar aislamientos dentro de un serotipo (Sandt y col., 2013).

Con respecto a SE, si bien se observó que el aislamiento proveniente del ambiente hospitalario presentó un patrón de multirresistencia mientras que los provenientes de granja solo presentaron una sensibilidad disminuida a CIP, se observó un único patrón de restricción en el dendrograma de PFGE independiente del origen del aislamiento. Sandt y col. (2013) reportaron que la presencia del patrón de SE encontrados en humanos también

se encontraron en las cepas del mismo serovar provenientes de aves durante todos los años del estudio (2005 a 2011) y sugieren un potencial impacto en la salud pública, que requiere una mayor investigación para determinar qué características sostienen la persistencia de este serovar y qué medidas podrían disminuir su incidencia.

Murase y col. (2004) reportaron que 50 aislamientos de *S. ser. Livingstone*, provenientes de aves de postura, presentaron 4 patrones de restricción utilizando la PFGE. Por otro lado, Eriksson y col. (2005) reportaron que 7 de 32 aislamientos de *S. ser. Livingstone* provenientes de aves, presentaron 3 patrones de restricción considerando el 80 % de similitud. A diferencia de estos autores, en este trabajo de tesis, los aislamientos de *S. ser. Livingstone* aisladas de 3 galpones diferentes de aves de postura en diferentes años (2015 y 2016) presentaron un único patrón de restricción genético, concordante con los mismos patrones de sensibilidad a los 29 ATB estudiados. Sin embargo, no se pudo determinar si existe o no relación con aislamientos de pacientes humanos y ambiente hospitalario, ya que no se obtuvieron aislamientos de este serovar.

Conclusiones Finales

✓ El porcentaje de aislamiento de SG en muestras ambientales es bajo en galpones con antecedentes de brotes de TA. La presencia de SG en muestra de alimento para aves de postura explica la posible ruta de ingreso de este biovar en las aves.

✓ Aun en presencia de distintos serovares de salmonelas tipo móviles en el ambiente de los galpones con antecedente de brote de TA, en su mayoría, sólo se aísla SG de las aves del mismo.

✓ Los medios selectivos diferenciales (MC y SS) utilizados para el aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de muestras órganos tanto en aves muertas naturalmente como en aves agónicas sacrificadas son similares en cuanto a Ser y EXAr, por lo que pueden ser utilizados indistintamente en galpones con sospecha de brotes de TA.

✓ Los medios selectivos y diferenciales XLDT y EF-18 utilizados en muestras ambientales (alimento y guano) son similares en cuanto a Ser y EXA, por lo que pueden ser utilizados indistintamente. Por otro lado, para muestras de hisopados cloacales individuales en aves agónicas se recomienda la utilización de ambos medios para mejorar el aislamiento de este biovar, dada sus diferencias en cuanto a Ser y EXA.

✓ Para aumentar la tasa de aislamiento de SG en aves agónicas en brotes de TA, se deben combinar muestras de hígado, bazo, médula ósea o contenido de folículo con el contenido de ciego o hisopado cloacal. Si bien el hisopado cloacal individual no es una buena muestra para aislar SG en brotes de TA, permite aislar otro tipo de serovares, (co-infección) que pueden afectar a las aves.

✓ Los resultados de la encuesta sugieren que mantener un plan de vacunación y aplicar un control de moscas pueden prevenir la introducción de *S. ser. Gallinarum* biovar Gallinarum y la contaminación en las granjas de gallinas ponedoras con antecedentes de TA.

✓ Aun cuando se presentan valores sanguíneos que pueden modificarse con la edad de las aves, existe un mayor recuento total de glóbulos blancos y porcentaje de heterófilos y menor porcentaje de linfocitos en animales positivos al aislamiento de SG y la prueba de aglutinación rápida en placa, por lo que pueden usarse como indicadores de la infección por este biovar.

✓ Existen diferencias estadísticas entre los resultados de las técnicas de aislamiento de SG, ARP y LF. Esto implica que la primera es la mejor técnica de las 3 para confirmar un brote de TA.

✓ Las cepas de SG están distribuidas en 11 clusters y 5 patrones únicos, incluyendo a la cepa vacunal 9R, utilizando ERIC-PCR y PFGE, respectivamente, con un 100% de similitud. El cluster más prevalente posee aislamientos correspondientes a 5 provincias

(Santa Fe, Tucumán, Buenos Aires, Jujuy y Entre Ríos) aislados en los años 2014, 2015 y 2016 por lo que podría presuponerse que los aislamientos de SG pertenecen a un mismo clon circulante que además es persistente en el tiempo. Sin embargo, estos datos requieren confirmación.

✓ La técnica de PFGE permite diferenciar mediante patrones genéticos la cepa vacunal 9R de los aislamientos de SG aisladas de galpones con antecedentes de TA.

✓ Dependiendo del serovar de *Salmonella* tipo móvil aislada de galpones con antecedentes de TA puede existir una relación clonal con los aislamientos de pacientes humanos y ambientes hospitalarios. Esto representa una alerta para maximizar los cuidados en la crianza de las aves de postura para disminuir el impacto de estos serovares en la salud pública.

✓ La presencia de cepas MDR de SG es una alerta ante el problema de las bacterias altamente resistentes a los antimicrobianos y por lo tanto indica la importancia del monitoreo de la sensibilidad a los ATB en avicultura.

✓ Los datos obtenidos no permiten inferir que se acepta la hipótesis con respecto a que el uso de terapia antimicrobiana favorece el incremento de cepas multiresistentes a distintos antibióticos en granjas de aves de postura con antecedentes de brotes de TA, ya que no se observa una diferencia en el porcentaje de cepas de SG MDR entre las granjas que habían indicado el uso de ATM de las que no.

✓ La presencia del gen *gyrA* y no del gen *qnrB* en todas las cepas de SG provenientes de galpones con antecedentes de TA indica que el mecanismo de resistencia al NA en SG está dado por mecanismos cromosómicos. En cambio, la presencia del gen *qnrB* en las cepas de *Salmonella* móviles provenientes de pacientes humanos y ambiente hospitalario indica que la resistencia a las quinolonas, si las hubiera, se debe a mecanismos plasmídicos.

✓ Los fenotipos de BLEE no tienen importancia en las cepas de SG estudiadas.

✓ Los patrones de multiresistencia más comunes en las cepas de SG, sin tener en cuenta la resistencia intrínseca a la E, son AN-S y AN-CIP-NOR.

✓ La presencia de sustancias inhibitoras en las muestras de contenido de huevo es cepa/serotipo dependiente, por lo que para su uso se recomienda utilizar al menos dos serotipos diferentes de *Salmonella* junto con la cepa control.

✓ La presencia de sustancias inhibitoras presentes en muestras de hígado y bazo en las aves de postura son un potencial peligro para la salud pública ya que dichos residuos pueden transmitirse hacia el producto final a consumir.

✓ El método cualitativo en agar Müller Hinton detecta mayor número de muestras con sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en comparación al kit comercial Explorer.

✓ La prueba de Equinox tiene que ser complementada con otra prueba más precisa, dado que dio resultados positivos para residuos con quinolonas en galpones que dijeron que no estaban utilizando ATM o que usaban ATM de familias diferentes a las quinolonas.

Proyecciones

- ✓ Estudiar el efecto de las sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano sobre la tasa de aislamiento de diferentes serovares de *Salmonella* spp.
- ✓ Estudiar la presencia de genes de resistencia presentes en SG como en *Salmonella* tipo móviles sensibles a los ATM, ya que pueden representar un reservorio de mecanismos de resistencia.
- ✓ Realizar secuenciación en las cepas de SG y *Salmonella* tipo móviles de las aves y su ambiente para poder determinar la mutación ocurrida en el gen *gyrA* que brinda la resistencia al ácido nalidíxico.
- ✓ Realizar estudio de secuenciación en cepas de *Salmonella* tipo móviles aisladas de pacientes humanos para determinar la proteína *qnrB* involucrada en la resistencia a quinolonas.

Referencias Bibliográficas

1. Aarestrup, F. M., Hendriksen, R.S.J. Lockett, K., Gay, K., Teates, P.F., McDermott, D.G. White, H., Hasman, G., Sørensen, A., Bangtrakulnonth, S., Pornreongwong, C., Pulsrikarn, F. J. Angulo, and P. Gerner-Smidt. 2007. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. *Emerg. Infect. Dis.* 13:726–731.
2. Abdel-Khalek, R., El-Gendy, A., Gamal, R.F., Abdelhady, H.M., House, B.L. 2015. Genetic characterisation of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotypes isolated from poultry in Cairo, Egypt. *Afr. J. Lab. Med.* 4:1-7.
3. Abdi, R.D., Mengstie, F., Beyi, A.F., Beyene, T., Waktole, H., Mammo, B., Ayana, D., Abunna, F., 2017. Determination of sources and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry industry in Southern Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* doi: 10.1186/s12879-017-2437-2432.
4. 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.
5. 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. *Appl Environ Microbiol* 67:4984-4991.
6. Aho, P. y C. Wright. 2010. La sustentabilidad y la industria avícola. *Industria Avícola.* 57: 12-38.
7. Akoachere JFTK, Tanih NF, Ndip LM, Ndip RN (2009) Phenotypic Characterization of *Salmonella* Typhimurium Isolates from Food-animals and Abattoir Drains in Buea, Cameroon. *J Health Popul Nutr* 27: 612–618.
8. Akter, M.R., Choudhury, K.A., Rahman, M.M., Islam, M.S., 2007. Seroprevalence of salmonellosis in layer chickens with isolation, identification and antibiogram study of their causal agents. *Bangladesh J. Vet. Med.* 5, 39–42.
9. Alanis A.J. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archiv Med Res.* 36:697–705.
10. Albarrán, P., M. Cruz-Coke y M. Gandarillas. 2011. La nueva forma de producir huevos. *Rev Agron Forest* 41:30-35.

11. Alcaine, S.D.; Warnick, L.D. y Wiedmann, M. 2007. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J Food Protect.* 70:780-790.
12. Alhendi, A.B.; Homeida, A.A.M.; Galli, E.S. Drug Residues in Broiler Chicken Fed with Antibiotics in Ration. *Veterinarski Arhiv* 2000, 70, 199–205.
13. AliAbadi, F.S. y Lees, P. 2000. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *Int J Antimicrob Agents* 14:307–313.
14. Alm-El-Dein, A.K.; Elhearon, E.R. Antibiotic Residue in Eggs of Laying Hens Following Injection with Gentamicin. *New York Science Journal* 2010, 3(11), 135–140.
15. Amass, S., Vyverberg, B.D., Ragland, D., Dowell, C.A., Anderson, C.D., Stover, J.H. and Beaudry, D.J. 2000. Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. *J Swine Health Product* 8, 169-173
16. 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 J Microbiol Res* 4:2202-2210.
17. Amiri, H.M.; Tavakoli, H.; Hashemi, G.; Mousavi, T.; Rostami, H.; Fesharaki, M.G.; Gholian, M. 2014. The Occurrence of Residues of Furazolidone Metabolite, 3-Amino-2-Oxazolidone, in Eggs Distributed in Mazandaran Province, Iran. *Scimetr.* 2(4),e19353. DOI:10.5812/scimetr.19353
18. Amjad, H.; Iqbal, J.; Naeem, M. 2005. Analysis of Some Residual Antibiotics in Muscle, Kidney and Liver Samples of Broiler Chicken by Various Methods. *Proc Pakistan Acad Sci.* 42(4), 223–231.
19. Anadón Navarro, A.R. 2007. Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. ISBN: 978-84-690-3480-4
20. Anderson, E.L., Stephens, J.F., 1970. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. *App. Microbiol.* 19, 726-730.
21. Andres, P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, Zorreguieta A; PMQR Group, Galas M, Corso A, Tolmasky ME, Petroni A. 2013. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2467-75. doi: 10.1128/AAC.01615-12.

-
22. Andrews, W. H., Jacobson A. & Hammack T. (2014). Salmonella. Bacteriological Analytical Manual. Accessed May 19, 2015. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.Htm>
23. Anónimo. (2009). Manual of Microbiological culture media. 2nd Eds. Zimbro, M. J. ; Power, D. A. ; Miller, S. M. ; Wilson, G. E. ; Johnson, J. A. BD Diagnostics-Diagnostics Systems. Sparks, Maryland.
24. Anónimo. 2013. Gallinas ponedoras y producción de huevo Una fuente de proteína animal de bajos costos, al alcance de todos. Sistema de información de precios y abastecimientos del sector agropecuario (SIPSA). 16:1-56.
25. Anónimo. 2018. Los 10 mandamientos de la bioseguridad en granjas avícolas – Cladan. <https://cladan.com.ar/los-10-mandamientos-de-la-bioseguridad-en-granjas-avicolas/> Acceso Marzo 2020.
26. Anónimo. 2019. Consumo per cápita de productos avícolas en países seleccionados 2018. Industria avícola. Vol. 66, N° 4. Pp. 27.
27. Apata, D.F. (2009). Antibiotic resistance in poultry. *Int J Poult Sci.*8:404-408.
28. Aragaw, K., Kebede, D., Demissie, K., Wondimu, K., Fekadu, A., y Abera, M. 2019. Salmonella Gallinarum-Pullorum Isolation from Sick and Dead Chickens in Hawassa, Southern Ethiopia. *Glob Vet* 21: 240-245.
29. Ardoino, S.M.; Toso, R.E.; Toribio M.S.; Álvarez, H.L.; Mariani, E.L.; Cachau, P.D.; Mancilla, M.V.; Oriani D.S. 2017. Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. *Ciencia Vet*, 19:50-66
30. Argüello, H., Carvajal, A., Costillas, S. and Rubio, P. (2013) Effect of the addition of organic acids in drinking water or feed during part of the finishing period on the prevalence of Salmonella in finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.*, 10(10): 842-849.
31. Asinmov, R., Brem, D., Heesemann, J. & Rakin, A. (2005). Transcriptional regulation of high pathogenicity island iron uptake genes by ybtA. *Int J Med Microbiol*, 295, 19–28.

32. Bada-Alamedji, R., Fofana, A., Seydi, M., and Akakpo, A.J. 2006. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Braz J Microbiol*, 37(4), 510-515. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400020>
33. Barnass, S., Franklin, J. & Tabaqchali, S. (1990). The successful treatment of multiresistant nonenteric salmonellosis with seven day oral ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, 25 , 299 /300.
34. Barro, N., Aly, S., Tidiane, O.C.A. and Sababenedjo, T.A. 2006: Carriage of bacteria by proboscises, legs, and feces of two species of flies in street food vending sites in Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Food Prot.* 69, 2007–2010.
35. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, Binns MM. 1987. Contribution of Salmonella gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect and Immun.* 55:388-392.
36. 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 Pathol* 20:681-692.
37. Barrow, P.A., Berchieri, Jr., A.A., y Al-Haddad, O. 1992. Serological Response of Chickens to Infection with Salmonella gallinarum-S. pullorum detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Avian Dis.* 36:227-236.
38. Barrow, P.A., Freitas Neto, O.C., 2011. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.* 40, 1-13.
39. 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. *J Appl Microbiol* 89:501-510.
40. 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.
41. 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. *Braz J Microbiol* 31:50-52.

42. Berchieri Junior, A., Murphy, C.K., Marston, K. & Barrow, P.A. 2001. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol*, 30, 221–231.
43. 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. *Appl Environ Microbiol* 77:5655-5664.
44. Beyene T. 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. *J Vet Sci Technol* 7:1-7.
45. Biazus, A.H., Da Silva, A.S., Bottari, N.B., Baldissera, M.D., do Carmo, G.M., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Casagrande, R., Guarda, N.S., Moresco, R.N., Stefani, L.M., Campigotto, G., Boiago, M.M., 2017. Fowl Typhoid in laying hens cause hepatic oxidative stress. *Microb. Pathogenesis*, 103, 162-166. Botros, M., Sikaris, K.A. 2013. The De Ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev.* 34: 117-130.
46. Bidawid, S.P., Edeson, J.F.B., Ibrahim, J. and Matossian, R.M. 1978. The role of non-biting flies in the transmission of enteric pathogens (*Salmonella* species and *Shigella* species) in Beirut, Lebanon. *Annals Trop Med Parasitol* 72, 117-121.
47. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14.
48. Botero Hoyos, L. A. (2007). Salmonellosis y su control. Engormix <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/salmonellosis-control-t1483/165-p0.htm>. Acceso Febrero 2020.
49. Botros, M., Sikaris, K.A. 2013. The De Ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev.* 34: 117-130.
50. Bounar-Kechih, S., Hamdi, T.M., Mezali, L., Assaous, F., and Rahal, K. 2012. Antimicrobial resistance of 100 *Salmonella* strains isolated from *Gallus gallus* in 4 wilayas of Algeria. *Poult Sci.* 91(5):1179-85. doi: 10.3382/ps.2011-01620.

51. 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 Res Int* 45:897-904
52. Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe y B. Swaminathan. 2000. Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol* 38:2465-2467.
53. 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. *J Vet Diagn Investig* 24:509-515.
54. Brugere-Picoux, J., Brugere, H., Basset, I., Sayad, N., Vaast, J. Michaux, J.-M., 1987. Biochimie clinique en pathologie aviaire. Intérêt et limites des dosages enzymatiques chez la poule. *Recueil Méd Vét*, 163, 1091-1099
55. Busse, M. 1995. Media for Salmonella. *Int J Food Microbiol* 26:117-131.
56. Cabrera, R.; Ruiz, J.; Ramírez, M.; Bravo, L.; Fernández, A.; Aladueña, A.; Echeita, A.; Gascón, J.; ALONSO, P. y Vila, J. 2006. Dissemination of Salmonella enterica serotype Agona and multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Thyphimurium in Cuba. *Am J Trop Med Hyg.*74:1049-1053.
57. Caffer MI, Pichel M, Viñas MR. 2014. Género Salmonella. En *Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"*. Buenos Aires, Argentina. p. 15-26
58. 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. *Asoc Arg Zoon*, Buenos Aires, Argentina.
59. 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

60. Caffer, M.I. y Terragno, R. 2008. Familia Enterobacteriaceae. En: Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina. p. 1-5.
61. Campbell, T.W. 1995. Avian Hematology and Cytology. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
62. Campbell, T.W. 1996. Clinical pathology. Reptile Medicine and Surgery (ed. D.R. Mader), pp. 248–257. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
63. Campbell, T.W., Coles, E.H., 1989. Patología Clínica de Aves. In: Diagnóstico y Patología Veterinaria, 4th ed., pp. 285-308. (México, Editorial Interamericana). Chacana, P.A., Terzolo, H.R. 2006. Protection conferred by a live Salmonella Enteritidis vaccine against fowl typhoid in laying hens. Avian Dis. 50, 280-283.
64. Cantón, R., Coque, T.M., Baquero, F. 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. Curr Opin Infect Dis. 16:315-325.
65. Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E.F., Cisse, M., Salvat, G., 2004. Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica infection in Senegalese broiler-chicken flocks. Prev. Vet. Med. 63, 151-161.
66. 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.
67. 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). J Appl Microbiol 107:1976-1983.
68. Center for disease Control and Prevention, Food and Drug Administration and National Institutes of Health. 2012. A public health action plan to combat antimicrobial resistance. Acceso Febrero de 2020. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/public-health-action-plan-combat-antimicrobial-resistance.pdf>
69. Cesur, A., Ulutaş, S.Ö., and Soyer, Y. 2019. Isolation and molecular characterization of Salmonella enterica and Escherichia coli from poultry samples. Turk J Vet Anim Sci. 43: 408-422.

70. Chacana, P. y H. Terzolo. 2003. Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. *Rev Med Vet* 84:14-20.
71. Chacana, P.A., Terzolo, H.R. 2006. Protection conferred by a live *Salmonella* Enteritidis vaccine against fowl typhoid in laying hens. *Avian Dis.* 50, 280-283.
72. Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., Puchades, R., 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trac. Trends Anal. Chem.* 29, 1038–1049.
73. Chaiba, A. and Rhazi-Filali, F. (2016) Prévalence de la contamination par *Salmonella* des élevages de poulet de chair au Maroc. *Cahiers Agriculture*. EDP Science, Les Ulis.
74. Chappell, L., P. Kaiser, P. Barrow, M. A. Jones, C. Johnston y P. Wigley. 2009. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 128:53-59.
75. 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. *J Food Protect* 72:2071-2077.
76. Chen, M.H., Wang, S.W., Hwang, W.Z., Tsai, S.J., Hsieh, Y.C., Chiou, C.S., and Tsen, H.Y. 2010. Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. *Poult Sci.* 89(2):359-65. doi: 10.3382/ps.2009-00001.
77. Chen, T.H., Y. C. Wang, Y. T. Chen, C. H. Yang, and K. S. Yeh. 2006. Serotype occurrence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from pork carcasses in Taiwan (2000 through 2003). *J. Food Prot.* 69:674–678.
78. Chiroma Mohammed, A., Adamu, S., Gadzama, J.J., Esiebo, K.A.N., Abdul salam, H., Balami, A.G., Enam Samson, J., Muhammad, Y., Atata Abdulhamid, J. 2017. Some plasma biochemical changes in layers experimentally infected with *Salmonella Gallinarum*. *African J Cell Pathol* 9:66-72.
79. Cloeckert, A., y S. Schwarz, 2001: Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT 104. *Vet. Res.* 32, 301–310.

80. CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved standard, Third edition. CLSI document M31-A3.

81. CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. United States: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

82. 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. *Microbiol* 150:1063-1071.

83. 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. *Int J Food Microbiol* 70:131-141.

84. Coll, P.; Coque, M. T.; Domínguez, M. A.; Vázquez, J.; Vila, J. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: métodos moleculares de tipificación epidemiológica en Bacteriología.

85. Conway, A. 2019. World egg production reaches 80-million.metric-ton mark. *Poult Trends*. Pp. 30-38.

86. Cotter, P.F., 2015. An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. *Poult. Sci.* 94, 512–517.

87. 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. *Poult Sci* 51:1312-1316.

88. Da Silva, N., Taniwaki, M. H., Amstalden Junqueira, V. C., Ferraz de Arruda Silveira, N., Da Silva do Nascimento, M. & Romeiro Gomes, R. A. 2013. Basic Techniques for the detection of the presence/absence of microorganisms. In: *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual*. 49-56, London, UK.

89. Darwish, W.S., Eldaly, E.A., El-Abbasy, M.T., Ikenaka, Y., Nakayama, S., Ishizuka, M., 2013. Antibiotic residues in food: the African scenario. *Jpn. J. Vet. Res.* 61, S13–S22.

90. Davis, A.K., Cook, K.C. y Altizer, S. 2004. Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *Ecohealth*, 1, 362–373.
91. Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22:760–772.
92. Dawson, B., Trapp, R.G., 2004. *Basic and Clinical Biostatistics*. McGraw-HillCompanies, Inc., New York, NY.
93. de Almeida Filho, N., L. D. Castiel y J. R. Ayres. 2009. Riesgo: concepto básico de la epidemiología. *Salud Colectiva* 5:323-344.
94. De Carli, S., Gräf, T., Kipper, D., Lehmann, F., Zanetti, N., Siqueira, F., Cibulski, S., Fonseca, A., Ikuta, N., Lunge, V. 2017. Molecular and phylogenetic analyses of *Salmonella Gallinarum* trace the origin and diversification of recent outbreaks of fowl typhoid in poultry farms. *Vet Microbiol.* 212: 80-86.
95. De Franceschi, M.; Viora, S.; Anselmo, R. y Barrios, H. 1999. *Salmonella Enteritidis* en huevos frescos. *Rev. Med. Vet.* 79:5-7.
96. De Gregorio, E.D., Silvestro, G., Petrilho, M., Carlomagno, M.S. & Nocera, P.P.D.N. 2005. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence repeats in *yersiniae*: genomic organization and functional properties. *J Bacteriol*, 187, 7945–7954.
97. 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 Poult Sci* 46:149-155.
98. De Souza, A.I., de Freitas Neto, O.C., Alves Batista, D.F., Celis Estupinan, A.L.P, de Almeida, A.M., Barrow, P.A. y Berchieri, A. 2015. ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum*, *Avian Pathol*, 44:6, 475-479, DOI: 10.1080/03079457.2015.1086975
99. De Souza, A.I.S., Alves Batista, D.F., de Almeida, A.M., de Freitas Neto, O.C., y Berchieri, A.Jr. 2015a. Utilização do ERIC-PCR para análise da variabilidade genética de isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum*.

<https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/utilizacao-eric-pcr-analise-t38643.htm>
(Acceso Marzo de 2020).

100. Dey, B.P., Thaker, N.H., Bright, S.A., Thaler, A.M., 2005. Fast antimicrobial screen test (FAST): improved screen test for detecting antimicrobial residues in meat tissue. *J. AOAC Int.* 88, 447–454.

101. 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. *Braz J Microbiol* 34:123-124.

102. Díaz Arango, G. 2019. La industria del huevo en Latinoamérica, breve perspectiva. *AviNews*. <https://avicultura.info/la-industria-del-huevo-en-latinoamerica-breve-perspectiva/> Acceso Febrero de 2020.

103. Dipeolu, M.A. y Alonge, D.O. 2012. Residues of Streptomycin antibiotic in meat sold for human consumption in some states of SW Nigeria. *Archivos de zootecnia* 51:477-480.

104. Dominguez, J.E. 2016. Estudio y evaluación de la dinámica de resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas en *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* en animales de producción. Tesis. Universidad Nacional de Buenos Aires Facultad de Farmacia y Bioquímica.

105. Dorneles, E.M., Santana, J.A., Ribeiro, D., Dorella, F.A., Guimarães, A.S., Moawad, M.S., Selim, S.A., Garaldi, A.L.M., Miyoshi, A., Ribeiro, M. G., Gouveia, M.G., Azevedo, V., Heinemann, M.B. & Lage, A.P. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. *PLoS One*, 9, e98758.

106. Dosoky R, Kotb S, Farghali M. 2015 Efficiency of silver nanoparticles against bacterial contaminants isolated from surface and ground water in Egypt. *J Adv Vet Anim Res* 2(2):175–84; <https://doi.org/10.5455/javar.2015.b79>

107. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):160–201.

108. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. 2009. Quinolones: Action and resistance updated. *Curr Top Med Chem.* 9:981–98.

109. 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.
110. Eaves, D.J., Randall, L., Gray, D.T., Buckley, A., Woodward, M.J., White, A.P., and Piddock, L.J. 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(10):4012-5.
111. Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*CTX-M genes. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(1):14-23.
112. 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.
113. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;15(12):5077, 228 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
114. EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.
115. EFSA. 2008. A quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat. Source attribution for human salmonellosis from meat. *EFSA Journal* 625:1-32.
116. Elgroud, R., Zerdoumi, F., Benazzouz, M., Bouzitouna-Bentchouala, C., Granier, S.A., Frémy, S., Brisabois, A., Dufour, B., and Millemann Y. 2008. Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria). *Zoonoses Public Health.* 56(2):84-93. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01164.x. Epub 2008 Aug 14.
117. El-Tras, W. F., A. A. Tayel y A. Samir. 2010. Potential zoonotic pathways of *Salmonella* Enteritidis in laying farms. *Vector Borne Zoonot Dis* 10:739-742.

118. Entis, P. 2002. Food Microbiology. The Laboratory. Páginas 25-48. Foods Processors Institute ed., Washington DC, U.S.A.
119. Errecalde, J.O. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO Producción y sanidad animal. Roma. p. 26.
120. Eswarappa, S. M., J. Janice, S. V. Balasundaram, N. M. Dixit, y Chakravorty, D. 2009. Host-specificity of *Salmonella* entérica serovar gallinarum: Insights from comparative genomics. *Infect. Genet. Evol.* 9:468–473.
121. Ezenduka, E.V.; Ike, O.S.; Anaelom, N.J. Rapid Detection of Antimicrobial Residues in Poultry: A Consequence of Non-Prudent Use of Antimicrobials. *Health* 2014, 6(2), 149–152.
122. Fasina, F.O., Rivas, A.L., Bisschop, S.P., Stegemanm A.J., Hernandez, J.A., 2011. Identification of risk factors associated with highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection in poultry farms, in Nigeria during the epidemic of 2006–2007. *Prev. Vet. Med.* doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.11.007.
123. Feberwee, A., de Vries, T.S., Elbers, A.R. & de Jong, W.A. (2000). Results of a *Salmonella* enteritidis vaccination field trial in broilerbreeder flocks in The Netherlands. *Avian Dis*, 44, 249:255.
124. Feberwee, A., de Vries, T.S., Hartman, E.G., De Wit, J.J., Elbers, A.R.W. & De Jong, W.A. (2001a). 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 Dis*, 45, 83:91.
125. Feberwee, A., Hartman, E.G., de Wit, J.J. & de Vries, T.S. (2001b). The spread of *Salmonella* gallinarum 9R vaccine strain under field conditions. *Avian Dis*, 45, 1024:1029.
126. Fendri, I., Ben Hassena, A., Grosset, N., Barkallah, M., Khannous, L., Chuat, V., Gautier, M., y Gdoura, R. 2013. Genetic Diversity of Food-Isolated *Salmonella* Strains through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). *PLoS ONE* 8: e81315. doi:10.1371/journal.pone.0081315.

127. Filadoro, A. 2015. Complejo Avícola-Carne y Huevo. Ministerio de Economía y Finanzas públicas. 1-46
128. Filipovic, N., Stojevic, Z., Milinkovic-Tur, S., Beer Ljubic, B., Zdelar-Tuk, M., 2007. Changes in concentration and fractions of blood serum proteins of chickens during fattening. *Vet. Arch.* 77, 319–326.
129. Foley, S.L., Johnson, T.J., Ricke, S.C., Nayak, R, y Danzeisen, J. 2013. Salmonella Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiol Molec Biol Rev.* 77:582-607.
130. Food Standars Australia New Zeland. 2009. Public Health and safety of eggs and aggsproducts in Australia. Pp: 3-12. ISBN 978-0-642-34568-4. https://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/Eggs_healthandsafety.pdf.
131. Fredricks, D. N. y D. A. Relman. 1999. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 29:475-486.
132. Freitas Neto, O.C., Arroyave, W., Alessi, A.C., Fagliari, J.J., Berchieri, A., 2007. Infection of commercial laying hens with Salmonella Gallinarum: clinical, anatomopathological and haematological studies. *Braz. J. Poult. Sci.*, 9, 133-141.
133. Freitas, A.R., Coque, T.M., Novais, C., Hammerum, A.M., Lester, C.H., Zervos, M.J., Donabedian, S., Jensen, L.B., Francia, M.V., Baquero, F., Peixe, L. 2011. Human and swine hosts share vancomycin-resistant Enterococcus faecium CC17 and CC5 and Enterococcus faecalis CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol.* 49:925-931.
134. Gaitán Herrera, A. 2001. Salmonella. In: Ed. Spencer, J. F. T. y Ragout de Spencer, A. L. Totowa, Food Microbiology Protocols., 113-117, New Jersey.
135. 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. *J Bacteriol* 174:4338-4349.
136. 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. *Appl Environ Microbiol* 74:6616-6622.

137. 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 Microbiol Rev* 33:718-738.
138. García, C.; Soriano, J.M.; Benítez, V. and Catalá-Gregori, P. 2011. Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poult Sci* 90 :1581–1585.
139. García, K.O., Santana, A.M., Freitas Neto, O.C., Simplicio, K.M.M.G., Alessi, A. C., Berchieri Júnior, A., Fagliari, J.J., 2010. Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum strain: Blood serum components and histopathological changes. *Braz J Vet Pathol*, 3, 111-117.
140. Garzón, J. M., A. Izaguirre y N. Zurita 2010. Aspectos productivos, comerciales y económicos de la Cadena Aviar en Argentina. http://www.ieral.org/images_db/noticias_archivos/1626.pdf. Acceso Febrero 2020.
141. Gast, R. K. 2007. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis* 51:817-828.
142. 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 Dis*. 51:40–44
143. 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.
144. Gast, R. K. 2013. Paratyphoid infections. In D. E. Swayne (Ed.), *Diseases of Poultry* (pp. 693–713, 718–733). Ames, IA: Wiley-Blackwell Publishing
145. Gast, R. K. y C. W. Beard. 1993. Research to understand and control *Salmonella* enteritidis in chickens and eggs. *Poult Sci* 72:1157-1163.
146. Gast, R. K. y P. S. Holt. 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poult Sci* 80:997-1002.
147. 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 Dis 49:382-386

148. Gast, R.K. 2003. 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. p. 583-599.

149. Gast, R.K. 2011. Controlling egg contamination with Salmonella Enteritidis by understanding its pathobiology. XXII Latin American Poultry Congress.

150. Gast, R.K., Nasir, M.S., Jolley, M.E., Holt, P.S. and Stone H.D. 2002. Detection of experimental Salmonella enteritidis and S. typhimurium infections in laying hens by fluorescence polarization assay for egg yolk antibodies. Poult Sci 81:1128-1131

151. Gaudin V, Hedou C, Rault A, Sanders P, Verdon E. 2009. Comparative study of three screening tests, two microbiological tube tests, and a multi-sulphonamide ELISA kit for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. Food Addit. & Contam.: Part A. 26:427-440.

152. Gernat, A. 2004. Poultry farm biosecurity. North Carolina State University Dept. of Poultry Science, North Carolina Cooperative Extension Service.

153. Giammanco, G. M.; Pignato, S.; Grimont, F.; Grimont, P. A.; Caprioli, A.; Morabito, S.; Giammanco, G. (2002). Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7 isolated in Italy and in France. J Clin Microbiol. 40: 4619-4624.

154. Gill, C.J., Lau, J., Gorbach, S.L., Hamer, D.H., 2003. Diagnostic accuracy of stool assays for inflammatory bacterial gastroenteritis in developed and resource-poor countries. Clin. Infect. Dis. 37, 365-375.

155. Giraud E, Baucheron S, Cloeckert A. Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes Infect. 2006;8(7):1937-44.

156. Giraud, E.; Baucheron, S.; Cloeckert, A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microb. Infect., 8, 1937-1944.

157. Goetting, V., Lee, K. A., Tell, L. A. 2011. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 34:521–556 doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01287.
158. Gonzalez, A. B. 1966. Lactose-fermenting Salmonella. *J Bacteriol* 91:1661-1662.
159. Grady, G. F., G. T. Keusch. 1971. Pathogenesis of bacterial diarrheas. *N. Engl. J. Med.* 285, 831-841.
160. GraphPad Software. 2018. McNemar's test to analyze a matched case-control study. <https://graphpad.com/quickcalcs/McNemar1.cfm>. (accessed February 25th, 2020).
161. Graziani, C., Busani, L., Dionisi, A.M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Ricci, A., Mancin, M., Caprioli, A. y Luzzi, I. 2007. Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet Microbiol.* 128:414-418.
162. Grigar, M.K., Cummings, K.J., Rodriguez-Rivera, L.D., Rankin, S.C., Johns, K., Hamer, G.L., Hamer, S.A., 2016. Salmonella Surveillance among great-tailed grackles (*Quiscalus mexicanus*) and other urban bird species in Eastern Texas. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16, 752-757.
163. Grimont, P. A. D., and Weill, F. X., 2007. Antigenic Formulae of the Salmonella serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institute Pasteur. 1-166.
164. Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. *Environ Microbiol* 3:421-430.
165. Guerrant, R.L., Araujo, V., Soares, E., Kotloff, K., Lima, A.A.M., Cooper, W.H., Lee, A.G., 1992. Measurement of fecal lactoferrin as a marker for fecalleukocytes. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1238–1242.
166. Gyles C, y Boerlin P. 2014. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol.* 51:328-40.

-
167. Hagren, V., Peippo, P., & Lovgren, T. (2005). Detecting and controlling veterinary drug residues in poultry. *Food Safety Control in the Poultry Industry*, 44–82. doi:10.1533/9781845690236.44
168. Hall, W.J., Legenhausen, D.H., y MacDonal, A.D. 1949. Studies on Fowl Typhoid I. Nature and Dissemination. *Poult Sci.* 28: 344-362.
169. Hanes, D. 2003. Nontyphoid Salmonella. In: Ed. Miliotis, M. D. y Bier, J. W. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. 137-149, New York, USA.
170. Harris, J.C., DuPont, H.L., Hornick, B.R., 1972. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann. Intern. Med.* 76, 697-703.
171. Hassan, M.A.; Heikal, G.I.; Gad-Ghada, A. 2014. Determenation of Some Antibacterial Residues in Chicken Giblets. *Benha Vet Med J.* 26(2) 213–218
172. Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(1):v.
173. Helmuth, R. (2000). Antibiotic resistance in Salmonella. p:89-106. En: *Salmonella in domestic animals*. Wray, C. and Wray, A. Ed: CAB International. UK.
174. Henderson, S.C., Bounous, D.I., Lee, M.D., 1999. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infect Immun* 67, 3580–3586.
175. Herranz, S., Moreno-Bondi, M.C. & Marazuela, M.D. (2007) Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. *J Chromatog A*, 1140, 63–70.
176. Hinckle, N.C and Hickle, L.A. 1999. California caged layer pest management evaluation. *J. Appl. Poult. Res.* 8:327-338.
177. 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. *Poult Sci* 90:251-262.
178. Hosmer, D. W. y S. Lemeshow. 2004. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons eds New Jersey, USA.

179. Hossain, K.M.M., Hossain, T.M., Yamato, I., 2010. Seroprevalence of Salmonella and Mycoplasma gallisepticum infection in chickens in Rajshahi and surrounding districts of Bangladesh. *Int. J. Biol.* 2, 74–80.
180. Howard, Z. R., A. C. O'Bryan, P. G. Crandall y S. C. Ricke. 2012. Salmonella Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res Int* 45:755–764.
181. Howard, Z.; O'Bryan, C.A.; Crandall, P.G. and Ricke, S.C. 2011. Salmonella Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res Int.* doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.030.
182. Huberman, Y. D. 2010. Tifosis Aviar. https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/tifosis_aviar_-_yosef_huberman.pdf Acceso Febrero de 2020.
183. Huicho, L., 1995. Diagnostic approach to acute infectious diarrhea: the state of the art. *Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines* 24,317–339.
184. Huicho, L., Campos, M., Rivera, J., Guerrant, R.L., 1996. Fecal screening tests in the approach to acute infectious diarrhea: a scientific overview. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15, 486–494.
185. Huicho, L., Garaycochea, V., Uchima, N., Zerpa, R., Guerrant, R.L., 1997. Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, 644–647.
186. 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. *Epidemiol Infect* 103:415-423.
187. 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. *Epidemiol Infect* 106:489-496.
188. 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. *Epidemiol Infect* 106:33-43.
189. Huneau-Salaün, A., C. Marianne, B. Sophie le, L. Françoise, 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. *Prev Vet Med* 89:51-58.

190. Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, A.T., y Tamura, Y. 2009 National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 51:35.

191. Islam, M.M., Haider, M.G., Chowdhury, E.H., Kamruzzaman, M., Hossain, M.M., 2006. Seroprevalence and pathological study of *Salmonella* infections in layer chickens and isolation and identification of causal agents. *Bangladesh J. Vet. Med.* 4, 79–85.

192. Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I., y Weill, F-X. 2014. Supplement 2008e2010 (no. 48) to the WhiteKauffmannLe Minor scheme. *Res Microbiol* 165: 526-530.

193. Jain, N.C. 1993 *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA.

194. Jajere, S.M. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World.* 12:504-521.

195. Jasson, V., L. Jacxsens, P. Luning, A. Rajkovic y M. Uyttendaele. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol* 27:710-730.

196. Jeffries, L. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *J Clin Pathol* 12:568-571.

197. 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.

198. Jones R.B., 1987. Assessment of fear in adult laying hens: correlational analysis of methods and measures. *Br. Poult. Sci.* 28, 319-326.

199. Jones, F. T. y K. E. Richardson. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult Sci* 83:384-391.

200. Kabir, J.; Umoh, V.J.; Audu-okoh, E.; Umoh, J.U.; Kwaga, J.K.P. Veterinary Drug Use in Poultry Farms and Determination of Antimicrobial Drug Residues in Commercial Eggs and Slaughtered Chicken in Kaduna State, Nigeria. *Food Control* 2004, 15, 99–105.
201. Kagambèga, A., Lienemann, T., Aulu, L., Troré, A.S., Barro, N., Siitonen, A., and Haukka, K. 2013. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates. *BMC Microbiol* 13:1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-253>
202. Kaiser, P., Rothwell, L., Galyov, E.E., Barrow, P.A., Burnside, J., Wigley, P., 2000. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*, *Microbiol.* 146, 3217-3226.
203. Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM. 2005. Serovars of *Salmonella* spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Braz J Poult Sci*;7(3):195-198.
204. Kaneko, J.J., 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.*, 5th ed. Academic Press, San Diego/London/Boston/NewYork/Sydney/Tokyo/Toronto, pp. 117–138.
205. 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. *Epidemiol Infect* 134:967-976.
206. Kang, M. S., A. Kim, B. Y. Jung, M. Her, W. Jeong, Y. M. Cho, J. Y. Oh, Y. J. Lee, J. H. Kwon, y Kwon, Y. K. 2010. Characterization of antimicrobial resistance of recent *Salmonella enterica* serovar Gallinarum isolates from chickens in South Korea. *Avian Pathol.* 39:201–205.
207. 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. *VetMicrobiol* 147:181-185.

208. 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. *Vet Microbiol* 160:491-495.

209. 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 fur Veterinarmedizin* 43:225-231.

210. Katz, S.E., Brady, M.S., 2000. Antibiotic residues in food and their significance. *Food Biotechnol.* 14, 147–171.

211. Kempe, M.; Verachtert, B. 2000. Cartridges with Molecularly Imprinted Recognition Elements for Antibiotic Residues Monitoring in Milk Cream. *Pure and Applied Biochemistry*. Lunds Universitét Centre for Chemistry and Chemical Engineering: Getingevägen, Lund 1–10 pp.

212. Kiesecker, J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:9900–9904.

213. Kilinc, B., Meyer, C., Hilge, V., 2007. Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 625–628.

214. King, S. y W. I. Metzger. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. hektoen enteric agar. *Appl Microbiol* 16:577-578.

215. Kong KF, Schneper L, Mathee K. β -lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2010;118(1):1–36.

216. Kongsoi, S., Nakajima, Ch. y Suzuki, Y. 2017. Quinolone Resistance in Non-typhoidal *Salmonella*. En: *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*, Mihai Mares, IntechOpen. 2017. Pp: 115-135. DOI: 10.5772/67154. Available from:

<https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-salmonella-and-salmonellosis/quinolone-resistance-in-non-typhoidal-salmonella> 2017.

217. Korzeniowski, O.M., Barada, F.A.; Rouse, J.D. R.L. Guerrant, R.L., 1979. Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of shigellosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 1031-1035.

218. Kosek, M., Yori, P.P., Gilman, R.H., Vela, H., Olortegui, M.P., Chaves, C.B., Calderon, M., Bao, J.P., Hall, E., Maves, R., Burga, R. & Sanchez, G.M. 2012. Facilitated molecular typing of *Shigella* isolates using ERIC-PCR. *The Am J Trop Med Hyg*, 86, 1018–1025.

219. Kotb S, Ahmed M, Hassan D, Soltan E. 2019. Stability of antibiotics in drinking water: An advanced approach towards the impacts of water quality parameters on doxycycline bioavailability. *J Adv Vet Anim Res.* 6(4):438–44.

220. Kumari, D., Mishra, S.K., Lather, D., 2015. Effect of supplementation of *Aswagandha* (*Withania somnifera*) on haemato-biochemical parameters of *Salmonella Gallinarum* infected broilers chicken. *Haryana Vet.* 54,1-6.

221. 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. 2010. Prevalence and characterization of *Salmonella Gallinarum* in the chicken in Korea during 2000 to 2008. *Poult Sci* 89:236-242.

222. Lamelas, k., G. Mair y G. Beczkowski. 2011. *Boletín avícola: anuario 2010*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 61. 1-43

223. Lampel, K. A., S. P. Keasler y D. E. Hanes. 1996. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 116:137-145.

224. Landoni MF, Albarellos G. 2015. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet J*; 205(1):21–7; <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.016>

225. Lang X.Y., Zhang Y., Jiang H., Liu J., Ni H. 2013. Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin. Development of an enterobacterial repetitive. *African J Microbiol Res.* 7:4001-4005.

226. Latimer, K.S., Bienzle, D., 2010. Determination and interpretation of the avian leukogram. In D.J. Weiss and K.J. Wardrop (Eds.), *Shalm's Veterinary Hematology* (346-357). Ames, Iowa, Blackwell Publishing Ltd.
227. Lauderdale, T. L., F. M. Aarestrup, P. C. Chen, J. F. Lai, H. Y. Wang, Y. R. Shiau, I. W. Huang, and C. L. Hung. 2006. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 55:149–155.
228. Lawal, J.R.; Jajere, S.M.; Geidam, Y.A.; Bello, A.M.; Wakil, Y.; Mustapha, M. Antibiotic Residues in Edible Poultry Tissues and Products in Nigeria: A Potential Public Health Hazard. *Int J Anim Vet Adv* 2015, 7(3), 55–61.
229. 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. *Poult Sci* 90:278-294.
230. Lee, H.-C., Chen, C.-M., Wei, J.-T., & Chiu, H.-Y. 2018. Analysis of veterinary drug residue monitoring results for commercial livestock products in Taiwan between 2011 and 2015. *J Food Drug Anal*, 26(2), 565–571. doi:10.1016/j.jfda.2017.06.008
231. Lee, S.K., Chon, J.W., Song, K.Y., Hyeon, J.Y., Moon, J.S. and Seo, K.H. 2013. Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella Gallinarum* isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poult Sci.* 92(10):2789-97. doi: 10.3382/ps.2013-03175.
232. Lee, Y.J., Kim, K.S., Kim, J.H. y Tak, R.B. 2004. *Salmonella gallinarum* gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Avian Pathol*, 33:2, 251-257, DOI: 10.1080/0301945042000195759
233. Lee, Y.J., Kim, K.S., Kwon, Y.K. & Tak, R.B. 2003. Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of *Salmonella gallinarum* isolated in Korea. *J Vet Sci*, 4, 161-166.
234. Liebana, E., Garcia-Migura, L., Breslin, M.F., Davies, R.H. & Woodward, M.J. (2001). Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 39, 154–161.

235. 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. *Japan J Infect Dis* 56:151-155.
236. 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.
237. Lolo, M., Pedreira, S., Fente, C., Vazquez, B.I., Franco, C.M. & Cepeda, A. (2005) Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction / purification and determinative HPLC-MS analysis. *J Agricult Food Chem*, 53, 2849–2852.
238. Lopes, P.D., Freitas Neto, O.C., Batista, D.F.A., Denadai, J., Alarcon, M.F.F., Almeida, A.M., Vasconcelos, R.O., Setta, A., Barrow, P.A., Berchieri Jr. A., 2016. Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *Vet. J.* 214, 40–46.
239. Lucas, A.M., Jamroz, C., 1961. Atlas of Avian Hematology. U.S. Department of Agriculture, Monograph, pp. 25–29.
240. Mac Faddin, J. F. 1980. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
241. Machuca, J., Briales, A., Labrador, G., Díaz-de-Alba, P., López-Rojas, R., Docobo-Pérez, F., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Baño, J., Pachón, M.E., Pascual, A. and Rodríguez-Martínez, J.M. 2014. Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:3203–15.
242. Machuca, J., Agüero, J., Miró, E., Conejo, M., Oteo, J., Bou, G., González-López, J.J., Oliver, A., Navarro, F., Pascual, A. y Martínez-Martínez, L. 2017. Prevalencia en España de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 35(8):485–490.

243. Maciorowski, K. G., P. Herrera, M. M. Kundinger y S. C. Ricke. 2006. Animal Feed Production and Contamination by Foodborne Salmonella. *J Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1:197-209
244. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Peterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. y Monnet, D.L. 2011. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2011, in press, May 7, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x [Epub ahead of print].
245. Mair, G. y Beczkowski, G. 2018. Boletín avícola 2018. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación. 81: 1-18.
246. Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge y R. Helmuth. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 69:290-296.
247. Mantilla, J., Pulido, M. y Jaime, J. 2010. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de salmonella grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 2010. 57:168-177.
248. Marin, C., and Lainez, M., 2009. Salmonella detection in faeces during broiler rearing and after live transport to the slaughterhouse. *Poult. Sci.* doi: 10.3382/ps.2009-00040.
249. Marshall BM, y Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24:718 –733.
250. Martin, S.W., 1977. The evaluation of tests. *Can. J. Comp. Med.* 41, 19–25.
251. Martínez, R. y Borghello, C. 2019. Informe avícola 2019. Dirección de Ganadería y Pesca de la provincia de Entre Ríos.
252. 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 Dis* 41:58-61

253. Maxwell, R.J., Cohen, E. & Donoghue, D.J. (1999) Determination of sarafloxacin residues in fortified and incurred eggs using on-line microdialysis and HPLC programmable fluorescence detection. *J Agricult Food Chem*, 47, 1563–1567.
254. Mayer, H.F. 1986. *Bromatología: higiene y control de alimentos*. Tomo 2. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.
255. Mehdizadeh, S.; Kazerani, H.R.; Jamshidi, A. 2010. Screening of Chloramphenicol Residues in Broiler Chickens Slaughtered in an Industrial Poultry Abattoir in Mashhad, Iran. *Iranian J Vet Sci Technol*. 2(1), 25–32.
256. Mella S, Acuña G, Muñoz M, Perez C, Labarca J, Zemelman R. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación *Rev Chil Infectol*. 2000;17(1):53-66.
257. Meluzzi, A., Primiceri, G., Giordani R. y Fabris G. 1992. Determination of blood constituents reference values in broilers. *Poult Sci* 71:337-345.
258. Messens, W., K. Grijspeerd y L. Herman. 2006. Eggshell penetration by Salmonella: a review. *World's Poult Sci J*. 61:71-85.
259. Mestorino, Nora. (2009). *Antimicrobianos en avicultura*. Cámara Argentina de Productores Avícolas -CAPIA-. https://www.researchgate.net/publication/305592763_ANTIMICROBIANOS_EN_AVICULTURA Acceso Marzo, 2020.
260. Miles, R. D. y P. J. Jacob. 2000. Feeding the Commercial Egg-Type Laying Hen. <https://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/30/35/00001/PS04700.pdf> Acceso Marzo de 2020.
261. Mine, Y. and Kovacs-Nolan, J. 2006. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *W. Poult. Sci*. 62:87-95.
262. Mølbak, K., Olsen, J.E., y Wegener, H.C. 2006. Salmonella infections. In *Foodborne Infections and Intoxications*. 3rd edition. Edited by Riemann HP, Cliver DO. The Netherlands: Elsevier; pp:57–136.

263. Mollenhorst, H., C. J. van Woudenberg, E. G. Bokkers y I. J. de Boer. 2005. Risk factors for Salmonella enteritidis infections in laying hens. *Poult Sci* 84:1308-1313.
264. Mountney, G. y Parkhurst, C. (2001). *Tecnología de productos avícolas*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
265. Mouttotou, N., Ahmad, S., Kamran, Z. y Koutoulis, K.C. 2017. Prevalence, Risks and Antibiotic Resistance of Salmonella in Poultry Production Chain. En: *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*. InTechOpen, London, United Kingdom. Pp: 215-234.
266. Muhammad, F.; Akhtar, M.; Zia-ur-Rahman; Javed, I.; Anwar, M.I. Role of Veterinarians in Providing Residue-Free Animal Food. *Pakistan Vet J* 2009, 29(1), 42–46.
267. Mund, M.D., Umair, H.K., Uruj, T., Bahar-E, M. and Asad, F. 2017. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review, *International Journal of Food Properties*, 20:7, 1433-1446, DOI:10.1080/10942912.2016.1212874
268. Murase, T., Nagato, M., Shirota, K., Katoh, H., and Otsuki, K. 2004. Pulsed-field gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive Salmonella enterica subsp. enterica serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm. *Vet Microbiol.* 99(2):139-43.
269. 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. *Prev Vet Med* 83:323-336
270. National Research Council, 2010. *Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching*. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
271. Nazifi, S., Mosleh, N., Ranjbar, V.R., y Khordadmehr, M. 2011. Reference values of serum biochemical parameters in adult male and female Iranian chukar partridge (*Alectoris Chukar*). *Aust J Basic Appl Sci* 5:252-256.
272. Nazir, S., Kamil, S.A., Riyaz, A., Mir, M.S., Darzi, M.M., Yasmine, A., Goudar, K.S. 2014. Pathology and colonization of internal organs after experimental

infection of broiler chickens with *Salmonella Gallinarum* through oral or intraperitoneal routes. *J. Trop. Livestock Sci.* 67, 53-60.

273. Nazir, S.S., Kamil, S.A., Darzi, M.M., Mir, M.S., Bhat, S.A., 2013. Haematological and some biochemical changes in experimental fowl typhoid infection in broiler chickens. *Comp. Clin. Pathol.* 22, 83–91.

274. Nisha, A., 2008. Antibiotic residues-a global health hazard. *Vet. World* 1, 375.

275. Nishiguchi, A., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ouchi, Y., Sugizaki, T., Tsutsui, T., 2007. Risk factors for the introduction of avian influenza virus into commercial layer chicken farms during the outbreaks caused by a low-pathogenic H5N2 virus in Japan in 2005. *Zoonoses Public. Health.* 54, 337–343.

276. Nunes, R.V., Broch, J., Wachholz, L., de Souza, C., Damasceno, J. L., Oxford, J. H., 2018. Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. *Poult. Sci.* 0, 1–9.

277. Ochoa-Reparaz, J., Sesma, B., Alvarez, M., Renedo, M.J., Irache, J.M. and Gamazo, C. (2004). Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res*, 35, 291:298.

278. Oh, G.H., Park, N.C., Kim, Y.H., Cho, M.H., Lee, J.K., Shin, S.H., Son, J.K. & Jyeong, J.S. (2000). Epidemiological properties of salmonellosis of poultry farms in Kyongbuk province at recent year. *Korean J Vet Serv*, 23, 45 /59.

279. OIE 2008. Manual de la OIE sobre los animales terrestres <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/> Acceso Enero 2020.

280. OIE 2012. Terrestrial Manual. http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.03.11_fowl_typhoid.pdf. Acceso Enero 2020.

281. OIE. 2018. Informe anual de la OIE sobre los agentes antimicrobianos destinados a ser utilizados en los animales. Tercer Informe. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_Third_Annual_Report_AMR.pdf. Acceso Febrero de 2020.

282. OIE. 2019. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf Acceso Febrero 2020.
283. Okamoto, A.S., Menconi, A., Goncalves, G.A.M., Rocha, T.S., Andreatti Filho, R.F., Savano, E.N. y Sesti, L. 2010. Reversion to Virulence Evaluation of a 9R Vaccine Strain of *Salmonella enterica* Serovar *Gallinarum* in Commercial Brown Layers. *Braz J Poult Sci.* 12:47-52.
284. Okocha R, Olatoye I, Adedeji O. 2018 Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Rev.* 39:21; <https://doi.org/10.1186/s40985-018-0099-2>
285. Olsen, S. J., E. E. DeBess, T. E. McGivern, N. Marano, T. Eby, S. Mauvais, V. K. Balan, G. Zirnstein, P. R. Cieslak, and F. J. Angulo. 2001. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant *Salmonella* infection. *N. Engl. J. Med.* 344:1572–1579.
286. Omwandho, C. O. A. y T. Kubota. 2010. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: a mini-review of contamination routes and limitations to effective control. *Jpn Agric Res Q* 44:7-16.
287. Orderiz, R.S. 2016. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un Hospital Pediátrico de la ciudad de La Plata. Tesis de Maestría.
288. Pallavi S, Foley SL, Nayak R, Kwon YM (2013) Massively parallel sequencing of enriched target amplicons for high-resolution genotyping of *Salmonella* serovars. *Mol Cell Probes* 27: 80–85.
289. Park, N.C., Do, J.C., Cho, K.H., Chang, S.J., Kwon, H.I. & Park, D.S. (1995). Prevalent characteristics of fowl typhoid and antibiotic susceptibility of *Salmonella gallinarum*. *Korean J Vet Serv*, 18, 113 /123.
290. Parvej, M.S., Nazir, K.H.M.N.H., Rahman, M.B., Jahan, M., Khan, M.F.R., Rahman, M. 2016. Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella Enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Pullorum* and *Gallinarum* from chicken, *Vet World* 9(1): 65-70.

291. Patiño, D.C. 2003. ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. Umbral Científico. Colombia. p. 48-56.
292. Patrick, M.E., Adcock, P.M., Gómez, T.M., Altekruise, S.F., Holland, B.H., Tauxe, R.V. and Swerdlow, D.L. (2004). Salmonella Enteritidis infections, United States, 1985-1999. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1-7.
293. Pattinson, M. 2008. Poultry diseases. 6ª ed. Elsevier Health Sciences.
294. Pavlov, A., Lashev, L., Vachin, I., Rusev, V., 2008. Residues of antimicrobial drugs in chicken meat and offals. *Trakia J Sci* 6, 23–25.
295. Petersen, L. 1997. A comparison of EF-18 agar and modified brilliant green agar with lutensit for isolation of Salmonella from poultry samples. *Acta Vet Scandin* 38:79-85.
296. Pfeiffer, D. 2010. Veterinary Epidemiology. An Introduction. Jhon Wiley & Sons.
297. Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; De Groot, B.; Friis, CH.; Jones, R.; Nightingale, CH.; Preston, R. and Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health?. A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* 53:28-52.
298. Piddock, L.V.J. (2002). Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol.Rew.* 26, 3-16.
299. Pont, S. 2008. Sistemas agroalimentarios: ovícola argentino. http://www.produccion-Animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/77-ovicola.pdf Acceso Enero 2020.
300. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(1):12-26.
301. 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.

302. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. 2010. Detection of the new metallo-beta-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 65:1604-1607.
303. Prida, J. 2015. Proyecciones de la avicultura Argentina. En: Planificación estratégica de la Industria Avícola Argentina 2016-2030. CAPIA, Buenos Aires, Argentina. Pp: 76-79.
304. Prosdocimo, F.M. 2013. Patogenesis experimental de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Gallinarum en producción avícola. PhD Thesis. <https://ri.unlu.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/rediu/361/PROSDOCIMO%20FLORENCIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed February 25th, 2020).
305. Pulido-Landínez, M., Sánchez-Ingunza, R., Guard, J., and Pinheiro do Nascimento, V. 2014. Presence of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in Commercial Laying Hens Diagnosed with Fowl Typhoid Disease in Colombia. *Avian Dis* 58:165–170.
306. PulseNet PFGE Standard Operating Procedure of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017. [Online] <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-Shigella-Salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.
307. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. 2016. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Rev Per Med Exper S Pub.* 33(1):32.
308. Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJ, Guerriero L, Vargas LJ, Zorreguieta A, Tokumoto M, Quiroga C, Tolmasky ME, Galas M, Centrón D. 2007. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:4466-70.
309. 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*. *Mol Cell Probes* 6:271-279.

310. Rana, M.S., Lee, S.Y., Kang, H.J., y Hur, J.S. 2019. Reducing Veterinary Drug Residues in Animal Products: A Review. *Food Sci. Anim. Resour.* 39:687:703. DOI <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e65>
311. Reina, J., Gomez, J., Serra, A. and Borell, N. 1993. Analysis of the antibiotic resistance detected in 2043 strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in stool cultures of Spanish patients with acute diarrhea (1986/1991). *J Antimicrob Chemother.* 32 , 765 /769.
312. Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56–63.
313. Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., and Barrett, T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):59-67.
314. 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.
315. Rose, N., F. Beaudreau, 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. *Prev Vet Med* 39:265-277.
316. Rossman, A.J., Chance, B.L., 1998. Workshop Statistics: Discovery with Data and Minitab. Springer-Verlag, NY, USA.
317. Ruiz B, J.D., Suárez, M.C., y Uribe, C. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Salmonella* spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 19:297:305.
318. Ruiz, B. 2018. Nutrido crecimiento avícola en Latinoamérica en 2017. *Industria Avícola.* Vol 65, N° 4. Pp. 6-8.
319. Ruiz, B. 2019. Baja producción de pollo en Latinoamérica, sube la de huevo. *Industria Avícola.* Vol 66, N° 4. Pp. 4-6.

320. Rupley, A.E. 1997. *Manual of Avian Practice*. W.B. Saunders Company, Philadelphia PA.
321. Sachdeva, P. & Viridi, J.S. 2004. Repetitive elements sequence (REP/ERIC) - PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. *FEMS Microbiol Lett*, 240, 193–201.
322. Sadeeq R, Tariq A, Ijaz A, Nazir AK, Bo H, Jian G. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Res Int*. 2018;1:14. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
323. Safarik, I., M. Safarikova y S. J. Forsythe. 1995. The application of magnetic separations in applied microbiology. *J Appl Bacteriol* 78:575-585.
324. Sandt CH, Fedorka-Cray PJ, Tewari D, Ostroff S, Joyce K, et al. (2013) A Comparison of Non-Typhoidal Salmonella from Humans and Food Animals Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antimicrobial Susceptibility Patterns. *PLoS ONE* 8(10): e77836. doi:10.1371/journal.pone.0077836.
325. Sannat, Ch., Patya, A., Rawat, N., Ghosh, R.C., Jolhe, D.K., Shende, R.K., Hirpurkar, S.D. and Shakya, S. 2017. Characterization of *Salmonella Gallinarum* from an outbreak in Raigarh, Chhattisgarh, *Vet World*, 10(2): 144-148.
326. Sanz, D., Mata, L., Condón, S., Sanz, M. Á., & Razquin, P. 2010. Performance of a New Microbial Test for Quinolone Residues in Muscle. *Food Anal Methods*, 4(2), 212–220. doi:10.1007/s12161-010-9151-7
327. Sattar, S.; Hassan, M.M.; Islam, S.K.M.A.; Alam, M.; Faruk, M.S.A.; Chowdhury, S.; Saifuddin, A.K.M. 2014. Antibiotic Residues in Broiler and Layer Meat in Chittagong District of Bangladesh. *Vet World*. 7(9), 738–743. DOI:10.14202/vetworld.2014.738-743
328. Schoenhard, D. E. y H. J. Stafseth. 1953. Growth curves of *Salmonella pullorum* in different media. *J Bacteriol* 65:69-74.
329. Segato G, Benett C, Angeletti R, Montesissa C, Biancotto G. 2011. Doxycycline and sulfadimethoxine transfer from cross-contaminated feed to chicken tissues. *Food Addit Contam*. 28(7):860–868.

330. Senanayake, S.S.H.M.M.L., Ranasinghe, S., Waduge, R., Nizanantha, K., Alexander, P.A.B.D., 2015. Changes in the serum enzyme levels and liver lesions of broiler birds reared under different management conditions. *Trop. Agric. Res.* 26. 584-595.
331. SENASA. 2002. Plan Nacional de Sanidad Avícola.
332. SENASA. 2015. Res. 591/2015. Programa Nacional de Vigilancia de Resistencia a los antimicrobianos en los animales destinados a consumo humano. http://www.senasa.gov.ar/sites/default/files/normativas/archivos/res_591-2015.pdf
333. SENASA. 2018. Manual de procedimientos de la Resolución Senasa N° 86/2016. Programa de vigilancia y control de la contaminación por *Salmonella* spp. en granjas avícolas comerciales. http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/AVES/PROD_PRIMARIA/SANIDAD_ANIMAL/MANUALES/2018/2._manual_de_procedimientos_operativos_vigilancia_y_control_de_salmonella_spp._en_granjas_avicolas_comerciales_res_senasa_ndeg_86.2016._version_2018.pdf
334. SENASA. 2019. Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal - Dirección Nacional de Sanidad Animal.
335. Seo, K.W., Kim, J.J., Mo, I.P., y Lee, Y.J. 2019. Molecular characteristic of antimicrobial resistance of *Salmonella Gallinarum* isolates from chickens in Korea, 2014 to 2018. *Poult Sci* 0:1–8.
336. Seri, H.I. Introduction to Veterinary Drug Residues: Hazards and Risks. Paper Presented at the Workshop: Veterinary Drug Residues in Food Derived from Animals (Our Goal of Protecting Consumers). The National Medicinal and Poisons Board, Khartoum, Sudan May 26–27th, 2013. http://www.sustech.edu/staff_publications/2013070315212363.pdf
337. 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. *Vet Immunol Immunopathol* 146:212-224.

338. Shah, S., Kamil, S., Darzi, M., Mir, M., Bhat, S., 2013. Haematological and some biochemical changes in experimental fowl typhoid infection in broiler chickens. *Comp. Clin. Pathol. J.* 22, 83.
339. Sharma, V, Jakhar, K.K, Tiwari, S., Nehra, V., Jangir, B.L., 2018. Biochemical studies in experimentally *Salmonella Gallinarum* infected broiler chicken intoxicated with alpha-cypermethrin. *J Pharm Innov* 7, 325-330.
340. Shivaprasad, H. L. 2000. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19:405–424.
341. 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.
342. Shivaprasad, H.L., and Barrow, P.A., 2008. Pullorum disease and fowl typhoid. In Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., and Swayne, D.E. (Eds). *Diseases of poultry*. 12 th ed. Blackwell publishing, Ames, Iowa, pp. 620-636.
343. Simaraks, S., Chinrasri, O., Aengwanich, W., 2004. Hematological, electrolyte and serum biochemical values of the Thai indigenous chickens (*Gallus domesticus*) in northeastern, Thailand. *Indian J. Sci. Technol.* 26, 425–430.
344. Sims, L. D. 2007. Risks associated with poultry production systems. *Asia Pac Vet Inform Serv*.
345. Singh S, Yadav AS, Singh SM, Bharti P. 2010. Prevalence of *Salmonella* in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. *Food Res. Int.* 43, 2017-2030.
346. 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. *Vet Record* 166:579-586.
347. Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ED). *Manual of Clinical Microbiology*. 9ª Edición. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003; pp 139-161.

348. Soria, M. A. 2012a. Presencia de Salmonella y características físicas de huevos destinados a consumo humano. Master Scientiae en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe.

349. 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. *Poult Sci* 91:2668-2676.

350. Soria, M., Bonnet, A., Bueno, D., 2015. Relationship of Salmonella infection and inflammatory intestinal response with hematological and serum biochemical values in laying hens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 165, 145–153.

351. Soria, M.A. 2012. Presencia de Salmonella y características físicas de huevos destinados a consumo humano. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.

352. Soria, M.A. y Bueno, D.J. 2015. Culture based methods to detect Salmonella from different poultry products. En: *Food Microbiology: fundamentals, challenge, and health implications*. Perkins, E. (Ed.). Nova Science Publishers Inc. New York. Pp: 59-86.

353. Soria, M.A., Soria, M.C. and Bueno, D.J. 2012b. A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction for Salmonella detection in egg content. *Poult Sci.* 91:2668–2676.

354. Soria, M.C. 2013. Salmonella y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

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

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

357. Soria, M.C., Soria, M.A. and Bueno, D.J. 2013b. Comparison of 3 culture methods and PCR assays for Salmonella gallinarum and Salmonella pullorum detection in poultry feed. *Poult Sci.* 92:1505-1515.

358. Soria, M.C., Soria, M.A., Bueno, D.J. and Colazo, J.L. 2011. A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction assay for Salmonella detection in poultry feed. *Poult Sci.* 90:2606-2618.
359. Soria, M.C., Soria, M.A., Bueno, D.J., Godano, E.I., Gómez, S.C., Vís Butron, I.A., Padin, V.M, y Rogé, A.D. 2017. Salmonella spp. contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. *Poult Sci* 00:1–11
360. Soria, MC. 2013. Salmonella y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales. Tesis doctoral. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/26201/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accessed Febrero, 2020).
361. Souza, R.B.; Ferrari, R.G.; Magnani, M.; Kottwitz, L.B.M.; Alcocer, I.; Tognim, M.C.B.; Oliveira, T.C.R.M. Ciprofloxacin susceptibility reduction of Salmonella strains isolated from outbreaks. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.41, n.1, p.497-500, 2010.
362. Stevens A, Kerouanton A, Marault M, Millemann Y, Brisabois A, et al. (2008) Epidemiological analysis of Salmonella enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *Int J Food Microbiol* 123:191–197.
363. Stolker, A.A.M. y Brinkman, U.A.Th. 2005. Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. *J Chromatog A.* 1067-15-53.
364. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 22:664–89.
365. Sturkie, P.D., Griminger, P. 1986. Body fluids: blood. In: Sturkie, P.D. (Ed.). *Avian physiology*. New York: Springer New York, 1986. p.102-128.
366. Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, et al. (2005) DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected Salmonella entérica serotypes. *J Clin Microbiol* 43: 3688–3698.

367. Szasz, G., 1969. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 15, 124–136.
368. Taddele, M.H., Rathore, R. and Dhama, K. 2012. Antibioqram Assay of *Salmonella Gallinarum* and Other *Salmonella enterica* Serovars of Poultry Origin in India. *Asian J Anim Vet Adv*, 7: 309-317.
369. Talebi, A., Asri-Rezaei, S., Rozeh-Chai, R. and Sahraei, R. 2005. Comparative studies on haematological values of broilers strains (Ross, Cobb, Arbor-acres, and Arian). *Int J Poult Sci.* 4:573-579.
370. Tarabla, H. D. 2000. *Epidemiología Diagnóstica. I.* Tosti ed. Centro de Publicaciones, Secretaría de Extensión UNL, Santa Fe, Argentina.
371. 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. *Poult Sci* 69:721-726.
372. Tejada, T.S., Silva, C.S.J., Lopes, N.A., Silva, D.T., Agostinetto, A., Silva, E.F., Menezes, D.B. y Timm, C.D. 2016. DNA Profiles of *Salmonella* Spp. Isolated from Chicken Products and From Broiler and Human Feces. *Braz J Poult Sci.* 18:693-700.
373. Tennant, B.C., Center, S.A., 2008. Hepatic function. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, San Diego., pp. 379–412.
374. Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33: 2233-2239.
375. 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 2020.

376. Terzolo, H. R. 2011. Bacteriological study of avian salmonellosis (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) in Latin America. Seminario Internacional de Salmonellosis aviar.
377. Terzolo, H. y Chacana, P. 2016. Fowl Typhoid in Laying Hens: Description of the disease and Protection Conferred by a Live *Salmonella Enteritidis* Vaccine. <https://en.engormix.com/poultry-industry/articles/fowl-typhoid-laying-hens-t36606.htm> Acceso Febrero 2020.
378. Thanner S, Drissner D, Walsh F. 2016. Antimicrobial resistance in agriculture. *mBio* 7(2):e02227-15. doi:10.1128/mBio.02227-15.
379. Threlfall, E. J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: Problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:141–148.
380. Torrent Mollevi, M. (1982). Producción de huevos. *Zootecnia básica aplicada*. Ed. Aedos, Barcelona, España. p. 63-75.
381. 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.
382. UE. 2011. Reglamento N° 517/2011 Diario Oficial de la Unión Europea 138:45-51.
383. USDA, 2006. Biosecurity guide for poultry and birds owners.
384. USDA. 2000. NAHMS Layers '99 *Salmonella enterica* sero-type Enteritidis in table egg layers in the U.S. Acceso Octubre 2012
385. Van Belkum, A, Struelens M, de Visser, A, Verbrugh, H, Tibayrenc, M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 547-560.
386. Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *P Ntl A Sci* 112, 5649–5654.
387. 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.

388. Van Hoorebeke, S. 2010. The effect of different housing systems on Salmonella and antimicrobial resistance in laying hens. <https://pdfs.semanticscholar.org/58dc/6dc84a9378c5ee34352189f2d7a0b70bc580.pdf>
Acceso Marzo de 2020
389. 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. *Prev Vet Med* 94:94-100.
390. 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>.
391. Van Immerseel, F., Studholme, D.J., Eeckhaut, V., Heyndrickx, M., Dewulf, J., Dewaele, I., Van Hoorebeke, S., Haesebrouck, F., Van Meirhaeghe, H., Ducatelle, R., Paszkiewicz, K. and Titball, R.W. 2013. Salmonella Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. *Vaccine*, 31, 4940–4945.
392. Vandenberghe, V., Delezie, E., Huyghebaert, G., Delahaut, P., Daeseleire, E. and Croubels, S. 2012. Residues of sulfadiazine and doxycycline in broiler liver and muscle tissue due to cross-contamination of feed, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29:2, 180-188, DOI: 10.1080/19440049.2011.631194
393. Vanselow, B. A., M. A. Hornitzky, K. H. Walker, G. J. Eamens, G. D. Bailey, P. A. Gill, K. Coates, B. Corney, J. P. Cronin, and S. Renilson. 2007: Salmonella and on-farm risk factors in healthy slaughter-age cattle and sheep in eastern Australia. *Aust. Vet. J.* 85, 498–502.
394. Veldman, K., Cavaco, L.M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N., Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Cerny, T., De Frutos Escobar, C., Guerra, B., Schroeter, A., Gutierrez, M., Hopkins, K., Myllyniemi, A.L., Sunde, M., Wasy, D. y Aarestrup, F.M. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in Salmonella entérica and Escherichia coli isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother*; 66:1278–1286. doi:10.1093/jac/dkr084.

395. Venturino, J. 2006. Bioseguridad en Granjas Avícolas. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/34-bioseguridad.pdf. Acceso Enero 2020.
396. Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19, 6823–6831.
397. Vincent U, Ezerskis Z, Chedin M, von Holst C. 2011. Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. *J Pharm Biomed Anal*. 54:526–534.
398. Viora, S., R. Anselmo, H. Barrios y M. D. Franceschi. 1993. Salmonella enteritidis en maples. *Rev Med Vet* 74:96-99.
399. Vuthy, Y., Lay, K. S., Seiha, H., Kerleguer, A., & Aidara-Kane, A. 2017. Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* and among *Salmonella* subsp. in chicken food chains. *Asian Pac J Trop Biomed*, 7(7), 670:674. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.002
400. Wales, A.D., Carrique-Mas, J.J., Rankin, M., Bell, B., Thind, B.B., Davies, R.H., Abdel-Khalek, R., El-Gendy, A., Gamal, R.F., Abdelhady, H.M., and House, B.L. 2015. Genetic characterisation of multidrug-resistant *Salmonella* entérica serotypes isolated from poultry in Cairo, Egypt. *Afr J Lab Med*. 4(1):1-7. <http://dx.doi.org/10.4102/ajlm.v4i1.158>
401. 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.
402. Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W. and Yue, M. 2019. Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016. *Front. Microbiol*. 10:985. doi: 10.3389/fmicb.2019.00985
403. Wattiau, P., C. Boland y S. Bertrand. 2011. Methodologies for *Salmonella* enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. *Appl Environ Microbiol* 77:7877-7885.

404. Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C, Ortiz F, Nuñez L, Piris L, Perez J. 2017. Primeros resultados de la vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana de patógenos transmitidos por alimentos, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. en tres poblaciones distintas. Paraguay. 2011-2012. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 15(2): 64-72
405. Whittow, G.C. (2000) *Sturkie's Avian Physiology*. *Sturkie's Avian Physiology*, 5th edn. Academic Press, London.
406. Wilson L.A., Sharp P.M. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Molec Biol Evol.* 23:1156–1168.
407. Yang, H., H. Chen, Q. Yang, M. Chen, and H. Wang. 2008. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrob. Agents Chemother* 52:4268–4273.
408. Yang, S.J., Park, K.Y., Kim, S.H., No, K.M., Besser, T.E., Yoo, H.S., Kim, S.H., Lee, B.K., y Park, Y.H. 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars *Enteritidis* and *Typhimurium* isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet Microbiol.* 86:295-301.
409. Yousef, A.E. y Carlstrom, C. 2006. *Salmonella*. En: *Microbiología de los alimentos*. Manual de laboratorio. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p:181-222.
410. Yu, L., Yan-Hong, F., Heng-Wen, Z., Pei, S., Jian-Zhong, W. & Zhong-Jun, Y. (2011). The analysis of ERIC-PCR genomic polymorphism of *Salmonella* isolated strains in pig carcass. *J Anim Vet Adv*, 10, 1694–1698.
411. 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. *Rev Arg Microbiol* 27:57-69.
412. Zaefarian, F., Reza Abdollahi, M., Cowieson, A., Ravindran, V. 2019. Avian Liver: The Forgotten Organ. *Animals* 9, 63

413. Zamora-Sanabria, R. y Molina Alvarado, A. (2017) Preharvest Salmonella risk contamination and the control strategies. In: Current Topics in Salmonella and Salmonellosis. InTechOpen, London. p193-213.

414. Zeckua, A.H. 2020. Uso del Análisis de Riesgo en la Evaluación de la Bioseguridad Avícola. <https://www.agromeat.com/286334/uso-del-analisis-de-riesgo-en-la-evaluacion-de-la-bioseguridad-avicola> Acceso Marzo 2020.

415. Zou W, Chen HC, Hise KB, Tang H, Foley SL, et al. (2013) Meta-analysis of pulsed-field gel electrophoresis fingerprints based on a constructed Salmonella database. PLoS One 8: e59224.

Anexo

1. Detección de sustancias inhibidoras presentes en huevo mediante kit comercial

El fundamento de la prueba consiste en que en el medio de cultivo específico y en condiciones adecuadas (65 °C), las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* germinan y se multiplican acidificando el medio, lo cual provoca un cambio de color del medio de cultivo de azul a amarillo. Si la muestra de alimento contiene una concentración de antimicrobiano superior al límite de detección de la prueba, el crecimiento bacteriano se inhibe y por lo tanto no se producirá el viraje de color del medio

II. Detección de quinolonas presentes en huevo mediante kit comercial

El fundamento de la prueba consiste en que al incubar el medio de cultivo del kit junto con *E. coli* a 37 °C, la bacteria crece modificando el potencial redox del medio provocando el viraje del indicador de azul a marrón-naranja.

III. Encuesta realizada en los 20 galpones de gallinas de postura con antecedentes de TA

ENCUESTA PARA DETERMINAR FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE SALMONELLAS TÍPICAS EN GRANJAS DE GALLINAS PONEDORAS

Protocolo	Fecha		
Números de galpones	Cantidad total de aves en el predio		
Localidad	Departamento	Provincia	
Línea genética		Blanca	Color
Categoría de SENASA	A	B	C
Conoce la resolución 542/2010?	SI	NO	

GALPÓN A MUESTREAR				
Cantidad de aves	Edad (semanas)		Nº de aves por jaula	
Están medicadas con ATB?	SI	NO	Qué ATB?	
% de postura	Mortandad acumulada		Mortandad semanal	
Nº de Tolvas:	Olor a amoníaco?		SI	NO
Galpón:	Tradicional	Automático		
Estado del galpón:	Bueno	Regular	Malo	
Integridad de la jaula:	SI	NO		
Sistema de bebedero:	canaleta	niple	Niple + copita	
Sistema de comedero	canaleta	otro		
Observación: Un galpón para ser categorizado como bueno debe cumplir con:		Techo: debe estar limpio e íntegro.		
		Lateral: debe tener el tejido y cortinas íntegras.		
		Piso: debe tener pasto libre de guano y materia fecal de roedores.		

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD EN LA GRANJA						
INGRESO AL PREDIO:						
Alambrado perimetral y puerta de entrada	SI		NO			
Equipos de desinfección de vehículos	SI	NO	¿Funciona?	SI	NO	
Cumple distancias de separación con granjas vecinas (1000 m)	SI	NO				
Posee equipamiento para el ingreso de personas	SI	NO	¿Lo usa?	SI	NO	
Registro documentado de ingreso de personas y vehículos	SI	NO				
Existencia de otras especies en el predio	SI	NO				
Otro: Canino Felino Orino Caprino Bovino Equino						

SISTEMA DE ELIMINACIÓN DE CADÁVERES						
Composta	Fosa abierta	Fosa cerrada	Incineración abierta		Incineración cerrada	
¿Controla las moscas?	SI	NO	¿Es efectivo?		SI	NO
¿Qué producto?			¿Se observan moscas?		SI	NO
¿Controla roedores?	SI	NO	¿Es efectivo		SI	NO
¿Qué producto?			¿Se observan cuevas o roedores?		SI	NO
Observaciones:						

ALIMENTO, AGUA, HUEVOS Y GUANO					
Alimento:	Elaboración propia	Adquirido	Análisis microbiológicos de materias primas?		SI NO
Usa acidificantes	SI	NO	Producto:		
Secuestrantes de micotoxinas?	SI	NO	Producto:		
Presentación	Pellet	Harina			
Composición del alimento	Maíz	Poroto de soja	Harina de soja	Harina de carne	
	Sorgo	Harina de pescado	Harina de pluma	Otros	
¿Realiza análisis del agua?	SI	NO			
Almacenamiento de los huevos:			Mismo galpón	Sala independiente	
¿Reutiliza el maple?	SI	NO			
¿Cuál es el destino del guano?	Campo propio	Fuera del predio	Estado:	Húmedo	Seco
SANIDAD					
¿Uso de ATB en las últimas 3 semanas?	SI	NO	¿Qué antibiótico?		
¿Vacuna para Salmonella?	SI	NO	Tipo de vacuna		
¿Frecuencia?					
¿Edad de vacunación?					
PERSONAL DE LA GRANJA					
¿Vive en el mismo predio?	SI	NO	Total de empleados		
¿Presentó alguno de estos síntomas?					
Dolor abdominal				SI	NO
Fiebre entre 8 a 72 h				SI	NO
Escalofríos				SI	NO
Náuseas y/o vómitos				SI	NO
Diarrea				SI	NO
¿Consultó a su médico de confianza por alguno de estos síntomas?				SI	NO

Continuación ANEXO 2.

Anexo IV. Puntos de cortes utilizados en las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en cepas de *Salmonella* sp. para

Categoría del antibiótico	Subgrupo	Antibiótico	Concentración (µg/disco)	S	I	R	Cita
Penicilinas	Aminopenicilinas	Ampicilina	10	≥ 17	14-16	≤ 13	CLSI Ed.25 2015
		Amoxicilina	10	≥ 17	14-16	≤ 13	CLSI Ed.25 2015
Inhibidores de betalactamasas	-	Amoxicilina / Ác. clavulánico	30	≥ 18	14-17	≤ 13	CLSI Ed.25 2015
Cefalosporinas	1 ^{ra} Generación	Cefalotina	30	≥ 18	15-17	≤ 14	CLSI Ed.25 2010
	2 ^{da} Generación	Cefoxitina	30	≥ 18	15-17	≤ 14	CLSI Ed.25 2015
	3 ^{ra} Generación	Cefixima	5	≥ 19	16-18	≤ 15	CLSI Ed.25 2015
		Cefotaxima	30	≥ 26	23-25	≤ 22	CLSI Ed.25 2015
		Ceftazidima	30	≥ 21	18-20	≤ 17	CLSI Ed.25 2015
		Cefpodoxima	10	≥ 21	18-20	≤ 17	CLSI Ed.25 2015
Carbapenemes	Carbapenemes	Imipenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19	CLSI Ed.25 2015
Quinolonas y Fluorquinolonas	1 ^{ra} Generación	Ácido Nalidixico	30	≥ 19	14-18	≤ 13	CLSI Ed.25 2015
	2 ^{da} Generación	Cirpofloxacina	5	≥ 31	21-30	≤ 20	CLSI Ed.25 2015
		Norfloxacina	10	≥ 17	13-16	≤ 12	CLSI Ed.25 2015
	3 ^{ra} Generación	Enrofloxacina	5	≥ 23	17-22	≤ 16	CLSI Vet 01-S2 Ed. 2008
Tetraciclinas	1 ^{ra} Generación	Tetraciclina	30	≥ 15	12-14	≤ 11	CLSI Ed.25 2015
	2 ^{da} Generación	Doxiciclina	30	≥ 14	11-13	≤ 10	CLSI Ed.25 2015
	3 ^{ra} Generación	Tigeciclina	15	≥ 21	-	≤ 16	Pasterán y col., 2012
Fenicoles	-	Cloranfenicol	30	≥ 18	13-17	≤ 12	CLSI Ed.25 2015
		Florfenicol	30	≥ 22	19-21	≤ 18	CLSI Vet 01-S2 Ed. 2008
Aminoglucósidos	Kanamicinas	Amikacina	30	≥ 17	15-16	≤ 14	CLSI Ed.25 2015
		Kanamicina	30	≥ 18	14-17	≤ 13	CLSI Ed.25 2015
	Estreptomicinas	Estreptomicina	10	≥ 15	12-14	≤ 11	CLSI Ed.25 2015
	Gentamicinas	Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12	CLSI Ed.25 2015
	Neomicinas	Neomicina	30	≥ 17	13-16	≤ 12	Zurita y col., 1989*
Antagonistas de la ruta del folato	Combinaciones	Sulfametoxazol/Trimetoprima	23,75/1,25	≥ 16	11-15	≤ 10	CLSI Ed.25 2015
Lipopéptidos	Polimixinas	Colistina	10	≥ 11	-	≤ 10	CLSI Ed.25 2015
Derivados del Ác. fosfónico	-	Fosfomicina	50	≥ 16	13-15	≤ 14	CLSI Ed.25 2015
Macrólidos	14 Carbonos	Eritromicina	15	≥ 21	16-20	≤ 15	CLSI Vet 01-S2 Ed. 2008
	15 Carbonos	Azitromicina	15	≥ 13	-	≤ 12	CLSI Ed.25 2015

*El punto de corte utilizado para Neomicina corresponde a bacterias Gram positivas, ya que este antibiótico se eliminó del CLSI en el año 2010. enterobacterias