

| | |
|----------------------|-------|
| FORMA DE ADQUISICIÓN | |
| DE INVENTARIO | 00367 |
| LOCALIDAD | |
| MAY. CALIFICACIÓN | |
| PRECIO | |
| DIST. | |



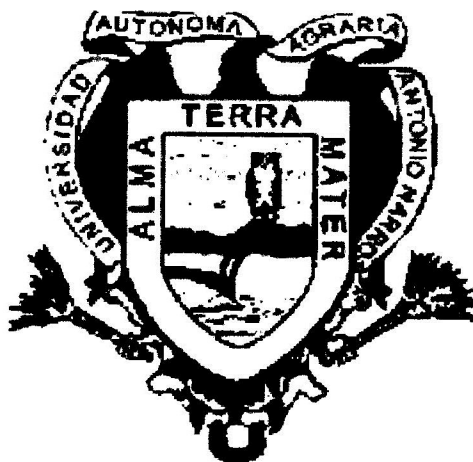
SF809
.S24
.M37 2005
TESIS
Ej.1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



"SALMONELLA ENTERITIDIS COMO CAUSA DE ZONOSIS A TRAVÉS DEL HUEVO COMERCIAL; IDENTIFICACIÓN Y ESTRATEGIAS DE CONTROL"

POR

JOSÉ MIGUEL MARÍN ZACARÍAS

MONOGRAFIA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR: MVZ. JESÚS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ

COASESOR: MVZ. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

MAYO DEL 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

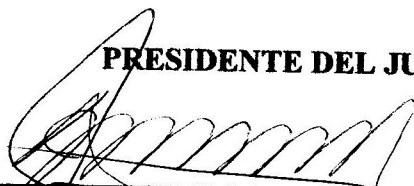
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**"SALMONELLA ENTERITIDIS COMO CAUSA DE ZONOSIS A TRAVÉS
DEL HUEVO COMERCIAL; IDENTIFICACIÓN Y ESTRATEGIAS DE
CONTROL"**

MONOGRAFIA

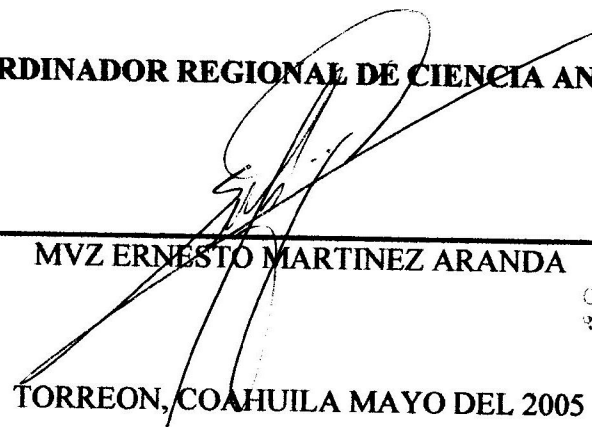
APROBADA POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO

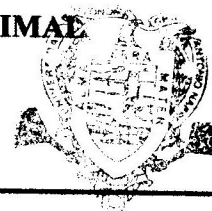


MVZ JESÚS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ

COORDINADOR REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



MVZ ERNESTO MARTINEZ ARANDA



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UJ.

TORREON, COAHUILA MAYO DEL 2005

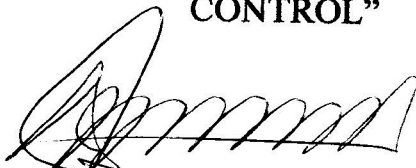
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

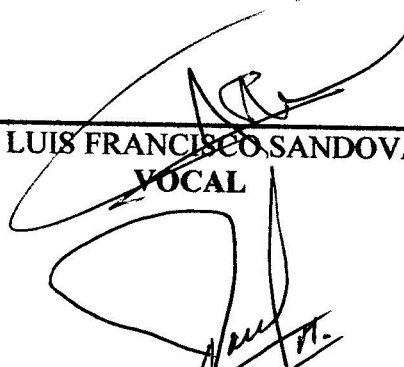
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**"SALMONELLA ENTERITIDIS COMO CAUSA DE ZONOSIS A TRAVÉS
DEL HUEVO COMERCIAL; IDENTIFICACIÓN Y ESTRATEGIAS DE
CONTROL"**




**MVZ. JESUS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ
PRESIDENTE**



**MVZ. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS
VOCAL**

**MVZ. M.E JOSÉ MONCEBAEZ PÉREZ
VOCAL**



**MVZ. JUAN MANUEL GUILLEN SÁENZ
VOCAL SUPLENTE**

Índice:

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.- Introducción | 1 |
| 2.- Características generales de Salmonella | 3 |
| 2.1.- Mecanismos de patogenicidad | 5 |
| 2.2.- Taxonomía | 5 |
| 3.- Epidemiología | 7 |
| 3.1 Alimentos de origen animal como causa de salmonelosis en el hombre. | 11 |
| 4.- El huevo comercial | 13 |
| 4.1.- La composición del huevo | 14 |
| 4.1.1.- La albúmina o clara..... | 16 |
| 4.1.2.- La yema..... | 17 |
| 4.2.- Medición de la calidad del huevo | 17 |
| 4.2.1.- El color..... | 18 |
| 4.2.2.- La limpieza. | 18 |
| 4.2.3.- La resistencia. | 19 |
| 4.2.4.- La calidad de la albúmina. | 21 |
| 4.2.5.- La calidad de la yema. | 21 |
| 5.- Transmisión de salmonelosis al humano a través del huevo | 23 |
| 5.1.- Diagnóstico en el hombre: | 25 |
| 6.- Salmonelosis en aves | 25 |
| 6.1.- Factores de infección huésped - Salmonella..... | 28 |
| 6.2.- Factores de infección por Salmonella enteritidis en aves | 30 |
| 6.3.- Aves portadoras | 31 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.4.- Infección de órganos internos | 32 |
| 6.5.- Eliminación fecal | 34 |
| 6.6.- Mortalidad en pollos | 34 |
| 7.- Transmisión vertical y horizontal a través del huevo | 35 |
| 8.- Factores internos de las gallinas que provocan la contaminación del huevo..... | 36 |
| 8.1.- Porcentajes de contaminación de huevo | 39 |
| 8.2.- Contaminación del cascarón | 40 |
| 8.3.- Pelecha forzada | 42 |
| 9.- Inmunidad | 44 |
| 10.- Métodos de identificación:..... | 46 |
| 10.1.- Muestreo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 48 |
| 10.2.- Muestreo con cargas electronegativas | 49 |
| 10.3.- ELISA: | 51 |
| 11.- Métodos de control | 52 |
| 11.1.- Vacunación | 55 |
| 11.2.- Uso de exclusión competitiva | 61 |
| 11.3.- Modelos de infección..... | 64 |
| 11.4.- Desinfectantes | 66 |
| 12.- Persistencia: | 67 |
| 12.1.- Vectores de la infección en las casetas avícolas | 67 |
| 12.2.- Resistencia a desinfectantes | 69 |
| 12.3.- Resistencia a los antibióticos | 70 |
| 13.- Referencias bibliográficas: | 71 |

1.- Introducción

El huevo es un alimento nutritivo y con bajo nivel de calorías y grasas y con todos los aminoácidos esenciales; es una fuente excelente de proteínas de alta calidad. Contiene 12 minerales y 13 vitaminas (52). La gran variedad de preparaciones que permite y su facilidad de cocinado han sido las razones de su empleo habitual para la elaboración de los platos más variados (4), actualmente, el consumo anual de huevo por habitante en México es de 14.4 Kg.

Las alteraciones en la calidad de los huevos están motivadas por una serie de factores que van desde el estado de salud de la ponedora, alimentación, manejo del ave, conservación y comercialización. También se producen en los huevos alteraciones por contaminación bacteriana, infestación por hongos, por acción enzimática y como consecuencia de la incubación (52).

Las gallinas infectadas natural o experimentalmente han puesto huevos con contenidos contaminados con Salmonella enteritidis, pero tales huevos son generalmente producidos a una baja frecuencia y usualmente contienen muy pequeños números de células de Salmonella enteritidis (26).

Aunque en la actualidad muchos otros patógenos han recibido considerable atención, las salmonelas permanecen entre las principales causas de enfermedad por alimentos contaminados en todo el mundo (10), y aunque más de 2200 serotipos de Salmonella son conocidos, solo los brotes de salmonelosis en humanos causados por Salmonella enterica subespecie enterica serovar enteritidis se han incrementado dramáticamente por todo el mundo desde la mitad final de los 80's se ha vuelto un tema económico y de salud pública internacional (26, 45), pues es una causa importante de salmonelosis humana relacionada al consumo de huevo mal cocido y productos de ave (53).

La Salmonella spp. Es una zoonosis (20, 61) y probablemente es la zoonosis más difundida en el mundo (1). Las especies de esta pueden ser causa de

enfermedades diarreicas en el humano (10,20), y una transmisión de humanos a animales también puede ocurrir.

La salmonelosis es una cuestión de seguridad para todos los alimentos de origen animal (61). Se presenta en todos los animales y su distribución es mundial. Su incidencia se ha aumentado con la intensificación de la producción de animales de granja (2).

Las salmonelas paratifoideas (PT), se pueden aislar de una gran variedad de especies huéspedes, incluyendo al ser humano y otros mamíferos, además de aves, reptiles e insectos. Las muchas interconexiones entre estos reservorios alteran con frecuencia los esfuerzos para reducir la incidencia de infecciones debidas a Salmonella en humanos y animales domésticos (10).

Las salmonelas de origen animal causan en el hombre una infección intestinal que se caracteriza por un periodo de incubación de 6 a 72 horas después de la ingestión del alimento, y una instalación brusca de fiebre, mialgias, cefalgía y malestar (1). Las personas con el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) son mucho más propensas, en general a las enfermedades zoonóticas, incluyendo infecciones por Salmonella en alimentos, y otros microorganismos entericos (1,2, 37, 59,62). Así como las personas con hemoglobina S/S (enfermedad de células falciformes o depreanocítica) son muy susceptibles a las infecciones por Salmonella (37,59).

El riesgo de enfermar debido a Salmonella enteritidis por consumo de huevo se puede reducir al mejorar el intervalo de tiempo-temperatura entre la adquisición y el consumo del producto. Además con un almacenamiento, una refrigeración y una cocción adecuadas son destruidas cualquier tipo de gérmenes (15).

2.- Características generales de Salmonella.

La salmonelosis es causada por muchas especies de Salmonella (1,2).

Estas bacterias se encuentran prácticamente en todo el mundo (1,10); las salmonelas infectan o son transportadas en una muy amplia variedad de huéspedes, incluso animales silvestres, domésticos y humanos (1, 10,62).

A los serotipos móviles de Salmonella, diferentes a los del subgénero S.arizonae, a menudo se les refiere como salmonelas paratifoideas (PT). Estos microorganismos pueden infectar a una gran variedad de huéspedes (incluso humanos); en algunos casos originan alteraciones intestinales relativamente sintomáticas, y en otros casos producen enfermedad clínica (2,10).

La Salmonella es una bacteria gram negativa, aerobia y anaerobia facultativa, intracelular facultativa (1,15,25) un bacilo dotado de motilidad que no esporula, y que mide 0.7 a 1.5 X 2.0 a 5.0 micras (10) y que característicamente fermenta glucosa y manosa sin producción de gas, pero no fermenta lactosa o sacarosa (10,37,62), produce ácido sulfhídrico y utiliza citratos (10, 14, 62), como única fuente de carbono (14), puede crecer bien en condiciones aerobias como anaerobias. La temperatura óptima para apoyar el crecimiento de las salmonelas es de 37° C, pero se observa cierto crecimiento en temperaturas de 5 a 45° centígrados (1, 10,15), y el pH en el que pueden crecer estas bacterias es de 4.0 a 9.0, con un pH óptimo de 7.0 (10).

Las salmonelas deben su patogenicidad principalmente a la capacidad para invadir los tejidos y sobrevivir dentro de los macrófagos. Las cepas que producen enterotoxinas invaden la pared intestinal con más eficacia y son más virulentas que las cepas no toxígenas (62), se han identificado dos toxinas proteínicas en salmonelas. La actividad de estas enterotoxinas por las salmonelas induce una respuesta secretoria de las células epiteliales que resulta en acumulación de

líquidos en la luz intestinal. Se detectó una enterotoxina termolábil en 44% de 123 cepas de S.typhimurium provenientes de animales; dicha citotoxina termolábil origina daño estructural a las células epiteliales, tal vez por inhibición de la síntesis de proteínas.

La adherencia y la invasibilidad de las salmonelas pueden estar influenciadas por las condiciones de crecimiento, ya que las células de Salmonella en crecimiento logarítmico resultan más invasivas en el tejido del cultivo que las células en cualquier fase de crecimiento (10).

Pueden sobrevivir por periodos largos sobre madera, heces, suciedad y a la deshidratación (1, 15, 29,61) y en agua congelada por periodos prolongados.

Las salmonelas son resistentes a ciertas sustancias químicas (p.ej, verde brillante, tetratoato de sodio, desoxicolato sódico) que inhiben a otras bacterias entericas; por lo tanto es importante incluir estos compuestos en los medios de cultivo para aislar salmonelas en heces (37).

Son fácilmente destruidas por la mayor parte de los desinfectantes y el calor (60°C durante 15 minutos) (1,29). Y la pasteurización a 7.1 grados centígrados durante 15 segundos es suficiente para destruir las salmonelas en la leche (1).

Las salmonelas paratifoideas pueden distinguirse de S. arizonae (Salmonella subgénero III), S. pullorum y S. gallinarum con base en varias diferencias bioquímicas, por ejemplo, las cepas S.arizonae no pueden fermentar mucato o dulcitol, y S. gallinarum no puede descarboxilar ornitina o producir gas a partir de la fermentación de glucosa. Además, las salmonelas PT por lo general son móviles, pero no así S.pullorum y S. gallinarum.

Algunos serotipos, en especial S. enteritidis, puede depositarse en el contenido de huevos limpios e intactos; por lo que el manejo inapropiado de los alimentos antes

del consumo, puede permitir la multiplicación de *Salmonella* a concentraciones capaces de originar enfermedades gastrointestinales graves en los consumidores humanos (10).

2.1 Mecanismos de patogenicidad

Se puede afirmar que la infección por *Salmonella* es una infección por fases, la gravedad de la cual dependerá de hasta donde progrese la infección. Así, la gastroenteritis adquirida normalmente por la ingestión de comida o agua contaminadas es el resultado de una infección restringida a la mucosa gastrointestinal.

En una fase posterior la bacteria invade el tejido linfático local. Este primer paso es seguido por una fase de bacteriemia durante la cual la mayoría de las bacterias son fagocitadas por macrófagos del hígado y del bazo. La ingestión de *Salmonella* por los macrófagos no elimina la infección, al contrario, inicia una fase de crecimiento bacteriano intracelular, el cual, después de varios días, provoca la liberación de gran cantidad de *Salmonella* al torrente sanguíneo.

Como resultado aparece una fuerte bacteriemia, efectos tóxicos, aparición de focos secundarios de infección y en algunos casos muerte del animal.

Actualmente se desconocen los mecanismos responsables de este sistema de actuación, aunque está influenciado por factores tales como virulencia de la *Salmonella*, edad, genotipo y estado inmunitario del animal (47).

2.2 Taxonomía

El género *Salmonella* (de la familia Enterobacteriaceae), nombrada así por el Médico Veterinario y Bacteriólogo Daniel E. Salmon se conforma por más de 2200

variantes serologicamente distinguibles (1, 37,62). Por lo general estos serotipos se nombran de acuerdo al lugar de aislamiento (10).

El grado de relación genética entre las salmonelas es tan grande, que algunos investigadores han sugerido que el genero consiste en realidad de solo un a especie, pero permanecen en uso común los nombres de los serotipos individuales para facilitar la clasificación diagnóstica y el análisis epidemiológico (10), en consecuencia se utiliza el término de serotipo directamente como especie (1).

El género *Salmonella* puede diferenciarse en 2 especies genómicas, más de 2.296 serotipos y multitud de biotipos, fagotipos y tipos patogénicos. Las bases genéticas y moleculares de tal diversidad se van conociendo cada vez mejor, especialmente gracias al estudio de las secuencias genómicas responsables de la diversidad antigénica que nos indican que algunos serotipos son el resultado de recombinaciones, especialmente entre genes flagelares (47).

Según el esquema actual de los centros de control de enfermedades (CDC) solo hay una especie de *Salmonella* que se divide en siete subgrupos (los subgrupos 1, 2, 3^a, 3b, 4, 5 y 6). Esta división se basa en reacciones de los cultivos con anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos O, H y Vi. Sin embargo la designación de *Salmonella enterica* para serotipos específicos es de gran importancia en estudios epidemiológicos y en el rastreo de fuentes de brotes de salmonelosis (31).

Los antiguos sistemas de clasificación comprenden 1) el sistema Kauffman – white, que indica cada serotipo como una especie individual de *Salmonella* (1); 2) el sistema Edwards. Ewing, que divide las salmonelas en tres especies (*Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*) y cientos de serotipos y 3) un esquema de hibridación de DNA que agrupa las salmonelas en una sola especie conocida como *Salmonella enteritidis*, y después la subdivide en las subespecies

arizonae, bungori, diarizonae, enterica, houtenae y salamae. Los CDC modificaron este último esquema para su uso actual (62).

3.- Epidemiología

El incremento mundial en los aislamientos de S. enteritidis en humanos está fuera de duda. Los datos del seguimiento de la OMS para Salmonella durante el periodo de 1979 a 1987 así lo indican. Durante este periodo el incremento se produjo en 24/35 (69%) de los países estudiados.

Mientras que en 1979 S. enteritidis era el serotipo más aislado en 2/21 (10%) de los países, la cifra subió a 9/21 (43%) en 1987 (Rodríguez et al., 1990). Asimismo, se constata una relación directa con el consumo de aves, huevos y sus derivados, aunque se desconocen las razones de esta pandemia.

La mayor importancia a los brotes de S. enteritidis se atribuyen al consumo de huevos y especialmente de sus derivados. Y siendo cierto que los huevos y sus derivados son fuentes de S. enteritidis, su importancia puede haberse sobreestimado.

La incidencia de huevos contaminados con Salmonella es muy baja. En estudios de huevos a partir de lotes de aves contaminados con S. enteritidis dan cifras inferiores al 0,1% (Report 1989, CESAC-sin publicar-1990). Y no sólo la incidencia de infección en el huevo es importante, sino también su localización (cáscara o interior del huevo).

Diversos estudios han demostrado que en general el número de bacterias presentes en el contenido del huevo es muy bajo, normalmente menos de 20 por huevo. Sin embargo, un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente permite su multiplicación hasta llegar a ser millares (47).

En los últimos años en algunos países se han incrementado los casos de infecciones alimentarias por el consumo de huevo contaminado con Salmonella; en España a partir de 1978 se han incrementado las infecciones debidas a Salmonella enteritidis asociada con huevos o con productos elaborados a base de huevo como la mayonesa. En los Estados Unidos huevos de gallinas infectados fueron responsables de varios informes de infecciones en el humano por Salmonella enteritidis entre 1976 y 1986, y en Inglaterra también ha sido implicada la Salmonella enteritidis PT4 y la Salmonella typhimurium en brotes por medio del huevo (39).

La epidemiología de Salmonella enteritidis es compleja e involucra interacciones humanas, ambientales y animales. Diferencias demográficas en humanos y animales, geografía, clima, y practicas de producción de huevo reflejan las asociaciones regionales de fagotipos de Salmonella enteritidis en aves y humanos (12), desde mediados de los 80's una dramática oleada en la incidencia de infecciones de humanos por Salmonella enteritidis han sido reportadas por autoridades de salud publica de todo el mundo (28).

La vigilancia epidemiológica por parte de las autoridades de salud es necesaria para apreciar la magnitud del problema en cada país, conocer el origen de los brotes y adoptar las medidas convenientes a fin de reducir los riesgos (1).

Las aves (pollos, pavos, y patos) constituyen el reservorio más importante de las salmonelas que entran en la cadena alimenticia humana. En Inglaterra y Gales, de 1981 a 1983, el 51.3% de 347 vehículos de salmonelosis humana estaba asociada con aves; en 1984 y 1985, el 32.2% de 177 vehículos fue de origen aviar (1).

Como la demanda de productos de ave se incrementa, el interés de la salud pública y seguridad de alimentos asume gran prioridad. La Salmonella enteritidis registró brotes ocurridos con incremento de frecuencia mundial, incluyendo Reino Unido, Europa, y EUA, aunque brotes y estudios han sido reportados en Tailandia, que tiene una gran industria exportadora de aves, la información sobre brotes en otras regiones de Asia permanece limitada (63).

La verdadera incidencia es difícil de evaluar, ya que muchos países no disponen de un sistema de vigilancia epidemiológica y en donde existen, los casos esporádicos y leves no suelen notificarse. En los países que tienen sistema de notificación, el número de brotes ha aumentado de modo considerable en los últimos años; este aumento es en parte real y en parte se debe a una mejor notificación (1).

Los primeros brotes de Salmonella enteritidis fueron reportados primero en el noreste de EUA, y estos brotes se difundieron subsecuentemente a otras partes del país para aparecer finalmente en la costa oeste en la década de los 90`s. las primeras investigaciones de estos brotes de origen alimentario implican en grado A a los huevos como la fuente en estos (35).

En años recientes, brotes de Salmonella enteritidis en alimentos tóxicos han ocurrido en Japón de manera similar a aquellas gastroenteritis de origen alimentario que han sido atribuidas al consumo de huevos contaminados en países europeos y EUA (21).

El creciente interés por la importancia de Salmonella enteritidis en salud pública, se demostró en una investigación respecto a la frecuencia de los informes de infecciones en humanos con varios serotipos de Salmonella en 21 naciones, solo 10% de estos países informó de Salmonella enteritidis como el serotipo más frecuente en 1979, pero para 1987 esta bacteria aumento a 43%. Entre 1985 y 1991, 82% de los brotes por Salmonella enteritidis en EUA que se pudieron atribuir a un vehículo alimenticio específico se vincularon con los huevos (10).

Debido a la única relación epidemiológica de Salmonella enteritidis con la transmisión de la enfermedad por huevos contaminados, la prevalencia específica de este serotipo ha sido un tema de considerable interés en los últimos años (10).

El fagotipo (PT por sus siglas en inglés) de Salmonella enteritidis más comúnmente asociado con brotes en EUA es el fagotipo 8. El fagotipo 4, es el

predominante en Europa, nunca había sido aislado en EUA hasta recientemente, cuando fue encontrado asociado con un brote en Texas y después en brotes alimentarios en California (35).

La prevalencia de infecciones debidas a otras serovariedades de *Salmonella* ha permanecido igual o ha declinado. Las razones para el incremento de la dominancia de *S. enteritidis* en los casos de intoxicación por alimentos en humanos es probablemente multifactorial; sin embargo, los análisis epidemiológicos sugieren a los huevos o productos de huevos contaminados como el mayor factor de riesgo para infección y como un serotipo específico de las fuentes de infecciones a *Salmonella enteritidis*, la prevalencia de este serovar en muchos países sugiere que puede tener características o capacidades únicas para contaminar huevos y de ese modo presentar un mayor riesgo a la salud pública que otros serovares de *Salmonella* en la incidencia de salmonelosis humana (45).

Algunos datos confirman que los brotes por *Salmonella enteritidis* (44%) son los que se encuentran más frecuentemente asociados al consumo de huevo contaminado, más que algún otro serotipo de *Salmonella* (15%) (15).

De acuerdo a los centres for diseases control prevention (CDC) la salmonelosis puede afectar cada año hasta 1 a 5 millones de personas en EUA; cada año se informa de casi 20000 hospitalizaciones y 500 muertes relacionadas con *Salmonella* (10,15), la incidencia de infecciones por *Salmonella* en las parvadas de la industria y la incidencia vinculada con la contaminación por la misma bacteria en los productos avícolas son, por lo tanto, de considerable importancia para la salud pública (10), por tanto resulta obvio que la vigilancia epidemiológica en animales, incluyendo las aves, es de suma importancia ya que la fuente de la gran mayoría de las salmonelosis humana no tíficas son alimentos de origen animal(1).

Los brotes a menudo son asociados con el consumo de alimentos contaminados, temperaturas de cocción inadecuadas, contaminación cruzada de ingredientes, e incapacidad para refrigerar alimentos a temperaturas que inhiban el crecimiento microbiano (35).

La epidemiología de la salmonelosis nosocomial tiene algunas características particulares. La edad de aparición en los pacientes parece ser un factor determinante en la susceptibilidad de infectarse por *Salmonella*. Los brotes provocados con grandes inóculos involucran tasas de ataque elevadas y periodos cortos de incubación (15).

El reservorio de las salmonelas zoonóticas son los animales. Prácticamente cualquier alimento de origen animal puede ser fuente de infección para el hombre (1).

Hipotéticamente, el cultivo de huevos de una parvada infectada con *Salmonella enteritidis* debe dar la mejor aproximación del riesgo de exposición humana. Sin embargo en la práctica es probable que la mayoría de exposiciones casuales no resultan en enfermedades de significancia clínica porque factores tales como susceptibilidad del huésped, dosis bacteriana, practicas de preparación de alimentos, etc., juegan papeles importantes (38), y a veces los métodos usados en las plantas de procesamiento de aves, permiten en general la diseminación de cualquier bacteria presente (62).

En México este tipo de infecciones se han notificado de manera ocasional, aunque se sospecha que la frecuencia puede ser mayor que en EUA, debido al escaso control que se tiene en la manufactura y distribución de alimentos (15).

3.1 Alimentos de origen animal como causa de salmonelosis en el hombre.

Las infecciones e intoxicaciones de origen alimentario son todavía una importante causa de morbilidad, manteniéndose una alta incidencia en los últimos años, a pesar de las campañas de educación sanitaria que se vienen realizando. Una vez

más, Salmonella enteritidis es el agente causal más frecuentemente detectado, tanto en los brotes de toxiinfecciones alimentarias como en el ambiente (56).

Con frecuencia, las salmonelas son patógenas para humanos o animales cuando se adquieren por vía oral. Se transmiten a los humanos a partir de animales y productos de éstos, y causan enteritis, infección sistémica y fiebre enterica principalmente en países industrializados (1, 12, 21, 34, 27,60).

Salmonella enteritidis es el responsable de un gran porcentaje de casos de intoxicación por alimentos, con algunas infecciones agudas resultando en la muerte de humanos jóvenes y adultos. Los brotes tales como estos son atribuidos al consumo de carne de ave y huevos mal cocidos (63).

En Estados Unidos la enteritis por Salmonella es la tercera forma de "intoxicación alimenticia" que se reporta con más frecuencia (62,60), los brotes de Salmonella enteritidis en humanos asociados con el consumo de huevo comenzaron a incrementarse en 1985 (1,17,24,32,51), y aunque muchos patógenos han recibido recientemente considerable atención, la Salmonella permanece entre las principales fuentes de gastroenteritis en humanos (49), también la carne de ave es una de las principales fuentes de salmonelosis de origen alimentario en este (9), y las salmonelas se diseminan de la carne de pollo al hombre si aquella se consume mal cocida o cuando quienes la manejan no lavan de manera adecuada sus manos o los utensilios (10,12,15,62), pueden sobrevivir varios meses en salmuera con 20% de sal, sobre todo en productos con un elevado contenido de proteínas o grasas, como salchichas saladas; también resisten el ahumado (1). Por esto la importancia de la salmonelosis radica precisamente en las transmisiones de tipo epidémicas que ocurren por ingesta o manipulación de huevos o carne contaminados, que provocan el clásico cuadro de fiebre, diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal (21), pero solo un limitado grupo de serotipos de Salmonella está asociado con aves y subsecuente enfermedad de origen alimentario en humanos (34).

La Salmonella es transmitida generalmente por ingestión de productos de origen animal, especialmente de aves, aunque brotes debidos al consumo de vegetales y

frutas contaminados con *Salmonella* u otros microbios patógenos se están volviendo más prevalentes (35).

El problema de la salmonelosis tal vez se agrava por el amplio uso de alimento de animales que contienen antimicrobianos lo cual favorece la proliferación de salmonelas resistentes a los fármacos y su posible transmisión al humano (37), en 1985 se presentó en Illinois, EUA, un brote que afectó a 20000 personas debido a la leche pasteurizada contaminada por *S. typhimurium* multiresistente a los antibióticos (ampicilina y tetraciclina) (1).

La dosis infectante promedio capaz de producir infección clínica o subclínica en humanos es de 10^5 a 10^9 salmonelas (37), aunque en años recientes se ha demostrado que basta una concentración de 3 a 10 células por gramo de alimento para causar enfermedad (15), y precauciones de higiene no son suficientes para garantizar productos libres de *Salmonella* (60).

Las Salmonelosis humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas (14).

4.- El huevo comercial

El huevo es uno de los alimentos mas antiguos que conoce el hombre, siendo citado ya en la Biblia y teniendo además, para muchas culturas, un indudable simbolismo religioso.

De hecho, no se puede saber cuando el hombre comenzó a utilizar el huevo para su consumo. Luego, de igual forma que aun hoy en los pueblos en vías de desarrollo, el hombre y la gallina conviven en su alojamiento, compitiendo muchas

veces por los mismos alimentos, el hombre de la antigüedad fue rodeándose de gallinas y también de algunas otras aves productoras de huevos con el fin de obtener un alimento de primer orden para la alimentación de su familia.

En México en el año 2002 la producción total de huevo fue de 1,900,608 toneladas (48), y el consumo nacional aparente en ese mismo año fue de 99.8, y el estimado del 2004 es de 99.9 (36).

4.1 La composición del huevo

La composición del huevo no es siempre uniforme ya que puede resultar afectada por la edad de la gallina, su alimentación, la raza o estirpe, la temperatura, etc.

Los mayores efectos sobre la composición provienen de la edad del ave al aumentar de tamaño, a medida que progresa la puesta. Al mismo tiempo se reduce ligeramente la cantidad de calcio y aumenta la de yema.

Mediante la alimentación también se puede influir sobre la composición del huevo en calcio, en lípidos totales, en vitamina A, etc. En cuanto a la influencia de la base genética del animal, ello no solo puede influir, por ejemplo, en su deposición de calcio en la cáscara sino incluso en el de algunas vitaminas, como la riboflavina.

Desde el punto de vista de la alimentación humana el huevo se considera como uno de los productos de más valor, cubriendo una parte muy importante de las necesidades del hombre.

La cáscara constituye la protección exterior del huevo, no teniendo ningún valor especial a no ser por lo que representa de “envase” natural del producto.

La cáscara del huevo contiene de 7000 a 17000 poros variando su tamaño de 13 micras en el polo ancho a 6 en el estrecho, lo que le confiere la permeabilidad requerida para el intercambio de gases durante la incubación. Su estructura es compleja y aunque, en principio, parecería que su grueso tiene que hallarse en

relación directa con su resistencia a la rotura, vale la pena indicar que, aparte de ello, hay otros factores involucrados influyendo en ésta.

La materia orgánica es casi totalmente proteína, la cual se halla en la fina cutícula que recubre la cáscara, así como en la porción mineral en la que forma como una matriz a la que se adhieren las sales minerales.

Estas se hallan constituidas casi totalmente por carbonato de calcio siguiéndole cantidades mínimas de carbonato magnesio, fosfato tricálcico, etc.

La cámara de aire

Aunque por su carácter de "espacio vacío" dentro del huevo, suele olvidarse, no podemos dejar de citarla por las implicaciones que tiene en lo que respecta a la calidad del huevo.

La cámara de aire es un espacio existente entre las dos membranas testáceas, la interna y la externa, hallándose colocada siempre en el polo más ancho del huevo y teniendo por misión la de proporcionar el aire necesario para el embrión al final del proceso de la incubación y pocas horas antes de que este perfore la cáscara, inicialmente en este punto.

El huevo fresco carece prácticamente de cámara de aire al hallarse las dos membranas bien adheridas entre si. Poco a poco, a medida que progresa el tiempo y ayudado por la acción de una buena temperatura (en la incubadora esta es de 38°C, con lo que el proceso es muy rápido), las membranas citadas van separándose en el punto citado, dejando una cámara de aire que puede tener varios milímetros (menos de 6 en el huevo fresco), de altura y que incluso puede llegar a 1 Cm. o mas en el huevo conservado.

4.1.1 La albúmina o clara

Constituye alrededor del 56% del peso del huevo, conteniendo el 88% de agua ya que actúa como el principal reservorio de ella para el embrión. Casi carente de grasas e hidratos de carbono, puede decirse que el resto está constituido de proteína.

Debido a influencias diversas, de un huevo a otro existen grandes diferencias en la proporción que contienen de albúmina densa (la más cercana a la yema) y de albúmina fluida (la más próxima a la cáscara). La medición de ello nos permite apreciar el grado de frescura del huevo ya que, a medida que este va envejeciendo, va aumentando la proporción de albúmina fluida a expensas de la densa.

La albúmina contiene dos gruesos filamentos que, en forma enrollada, se dirigen desde la yema a cada uno de los polos del huevo. Son las *chalazas*, siendo su misión la de mantener a la yema en posición centrada, lo que hace que con los huevos viejos, al perder parte de su resistencia, ésta se desplace fácilmente.

Desde el punto de vista desde su aprecio para el consumo, la relación albúmina densa/ albúmina fluida tiene una importancia enorme al valorarse más los huevos "frescos" en los cuales toda ella queda concentrada en una estrecha zona alrededor de la yema. Sin embargo, si bien para consumir el huevo fresco ello tiene gran importancia, tanto para numerosas elaboraciones reposteras como para la preparación de de huevos duros se obtiene mejor resultado con los que ya son algo viejos que con los de pocos días. En los huevos duros concretamente el problema que presentan los huevos frescos es que su pelado se realiza con mucha dificultad, adhiriéndose trozos de albúmina a la cáscara y reduciéndose así el rendimiento cuando ello se realiza a nivel industrial.

Nutritivamente, la albúmina es una fuente enorme de riboflavina de 0,2 a 0,5 g. por 100g. de albúmina, sobrepasando a la mayoría de los otros alimentos. Apenas contiene otras vitaminas hidrosolubles, hallándose también carente de de las

vitaminas A y D3, tan abundantes en la yema. En su pequeña proporción de minerales se hallan representados el cobre, el sodio, el potasio, el fósforo, etc.

4.1.2 La yema

La yema es la parte mas importante del huevo desde el punto de vista nutritivo ya que, aparte de su casi 50% de agua, contiene una buena proporción de grasas, proteína, vitaminas y minerales.

La proteína se halla principalmente en forma de fosfoproteína y en menor proporción de otra proteína rica en azufre. Entre las dos aportan una cantidad extraordinaria de aminoácidos esenciales.

La grasa se halla en forma de emulsión, estando constituida principalmente por ácidos grasos no saturados, lo que tiene importancia en la alimentación del hombre debido a la necesidad de este por ellos. También contiene *colesterol*, un alcohol cristalino que se halla en todas las células animales, aunque no en los tejidos vegetales, y que es, sin duda, una de las causas que han influido más negativamente en los últimos años en el consumo de huevos en algunos países.

La yema contiene además cantidades elevadísimas de vitaminas A, D3, B1, B2, etc. Y diversos minerales como el cobre, el magnesio, el fósforo, etc.

4.2 Medición de la calidad del huevo

La calidad de la cáscara

En ella hay que considerar los siguientes aspectos:

La forma. Solo si tiene importancia en el caso de ser muy irregular a efectos de intentar reducir las roturas cuando en una caja van huevos de distintos tipos, no interesando ni los casi excesivamente alargados, ni los casi totalmente redondos, etc. Se trata, sin embargo, de una consideración que no guarda ninguna relación con los parámetros de calidad interna.

No existe ninguna forma de valoración más que la puramente visual o subjetiva, valorándose, como es lógico, más los huevos limpios que los sucios.

4.2.3 La resistencia.

Una buena resistencia de la cáscara es sinónimo de que evitaremos los problemas de roturas, lo que es de mayor interés económico.

La resistencia de la cáscara se puede medir por diferentes métodos:

Determinación del grosor.

Rompiendo el huevo, se toma un trozo de cáscara seca (de la zona ecuatorial) y se mide su grosor con un tornillo micrométrico. Este se halla comprendido, aproximadamente, entre unos valores extremos de 0,28 y 0,35 mm., lógicamente tanto más alto cuanto mejor sea la calidad.

El método tiene como inconveniente el trabajo que proporciona por la medición individual de cada huevo, con un costo además elevado por tener que romper estos. De ahí que su empleo se limite solo a algunos laboratorios y situaciones experimentales.

Determinación de la densidad. Rompiendo igualmente el huevo, se corta un rectángulo de cáscara de una superficie determinada y una vez desecada, se pesa. La relación peso/ superficie expresa así la densidad de la cáscara, siendo lógico que a mayor densidad mayor de la resistencia a la rotura.

El porcentaje de la cáscara. Consiste también en romper el huevo y, una vez desecada, pesar la totalidad de la cáscara, peso que luego se compara con el que previamente se había tomado del huevo íntegro.

Una mayor cantidad de cáscara en relación con el peso total de huevo nos indicara la deposición de una mayor cantidad de minerales en la misma y, en consecuencia, una mayor resistencia a las roturas.

La resistencia a la presión. Se han diseñado aparatos para medir la resistencia que tienen los huevos antes de romperse ante unas presiones o fuerzas crecientes.

La resistencia a la punción. Supone asimismo conocer a partir de que momento se rompe el huevo a medida que se va aplicando con fuerza creciente la presión de un punzón o un aguja, que terminan por agujerar la cáscara.

La resistencia mecánica al traqueteo. Teóricamente debería ser uno de los métodos más exactos ya que se trata de imitar, en el laboratorio, unas condiciones de transporte como las que pueden existir en la práctica comercial. El aparato que se emplea es un agitador de laboratorio con una caja metálica adaptada de unas dimensiones determinadas, en la cual, habiendo colocado una docena de huevos íntegros, se comprueba al cabo de un minuto que cantidad de ellos aparecen con roturas a o resquebrajaduras.

La resistencia al aplastamiento. A diferencia de los métodos anteriores, no supone romper el huevo, sino de aplicar sobre el mismo, puesto de lado, una fuerza de 500g y observar en una escala graduada el grado de deformación que sufre a consecuencia de ello. Cuanta mayor es la deformación, menor es el grosor de la cáscara que se le supone al huevo.

La gravedad específica. Como puede verse, a excepción de este último método, todos los demás suponen la rotura de los huevos, lo que los convierte en lentos y costosos. Por otra parte, se basan en la medición de un sinnúmero de huevos individuales, lo que les convierte aun en más engorrosos. Por último, tampoco están lo suficientemente estandarizados como para que los valores obtenidos en un centro puedan ser comparados con los de otro.

De ahí el creciente empleo del método de gravedad específica que no precisa esa rotura y puede llevarse a cabo sin ningún instrumento especial.

4.2.4 La calidad de la albúmina.

Su observación es lo que permite determinar con más facilidad la verdadera calidad interna del huevo o su "frescura".

Aunque tiempo atrás se pretendió utilizar un "índice de albúmina" para expresar su calidad (la relación existente entre su altura en el punto más elevado y el diámetro del huevo abierto), en la práctica solo se utilizan las *Unidades Haugh*.

Las unidades Haugh son una forma de expresión logarítmica ideada por este investigador para expresar la calidad del huevo en función de su peso y de la altura de la albúmina.

Lo primero a hacer antes de abrir el huevo es pesarlo con precisión. Seguidamente, una vez abierto, se deja sobre una superficie lisa y con ayuda de un calibrador especial o una regla graduada se mide la altura de la albúmina en la parte más elevada, la más cercana a la yema.

Comparando dos huevos de igual peso, la mejor calidad interna corresponde a aquel con mayor altura de albúmina. Y comparando dos huevos con igual altura, tiene mejor calidad interna aquel que pesa menos.

4.2.5 La calidad de la yema.

También aquí existe el llamado "índice de yema", siendo la relación entre su altura máxima y su diámetro. Sin embargo, en la práctica no se utiliza toda vez que, implícitamente, la determinación de una buena calidad interna con base en las unidades Haugh ya nos señala una buena altura de la yema.

Los caracteres que nos interesan de la yema son:

La presencia o ausencia de manchas de sangre. Se detectan mediante el *miraje* de los huevos, realizado rutinariamente antes de la clasificación a nivel mayorista,

aunque esta operación solo permite conocer y separar a aquellos que muestran unas manchas de cierto tamaño (mayor de 2mm). A nivel de laboratorio, al abrir los huevos para determinar su calidad interna, si ello se realiza sobre un vidrio y debajo del cual se coloca un espejo inclinado, se pueden ver perfectamente las manchas de sangre.

Una variante de las manchas de sangre de los huevos son las denominadas incorrectamente las manchas de "carne". Y otra situación en la que uno puede encontrarse a veces es la del "moteado" de la yema de los huevos.

La pigmentación.

Es un factor de máxima importancia para la valoración de los huevos en el mercado al existir algunos mercados que prefieren las yemas con el máximo color amarillo posible e incluso anaranjado o rojizo, en tanto que otros se hallan en la situación contraria, rehusando incluso unos huevos muy pigmentados.

La pigmentación de la yema del huevo depende exclusivamente de la alimentación que recibe la gallina y, más concretamente, del nivel total y del tipo de xantofilas contenidas en el pienso. Estas xantofilas, en principio, se hallan aportadas por materias primas naturales como el maíz amarillo, la harina de alfalfa, etc., así como por determinados productos concentrados, como son las diferentes formas comerciales de la flor de marigold *Tagetes erecta*, aunque también puede recurrirse a la incorporación al pienso de preparados tales como el Apocaroteno éster.

La importancia de la pigmentación de la yema puede realizarse por:

Un método subjetivo, como es el empleo del ampliamente conocido *Abanico Calorimétrico Roche* u otros similares. Comparando el color de la yema del huevo abierto con la escala de esta abanico, graduada de 1 a 15, uno puede determinar a cual corresponde, teniendo así los tonos amarillos muy pálidos unos valores muy

inferiores a 7, los amarillos intensos desde esta cifra hasta 12 y llegando los anaranjados hasta el máximo.

Un método objetivo, como es el representado por el *Cronometro Minolta*, basado en la emisión y medición inmediata de una fuente de luz que, reflejada sobre la yema del huevo (como podría ser sobre cualquier otro objeto) proporciona de forma instantánea los valores de luminosidad, amarillamiento y enrojecimiento de la misma. Conectando a un procesador, el aparato indica de una forma totalmente independiente de la apreciación subjetiva de un observador los parámetros citados, que expresan el grado de pigmentación de la yema.

No obstante, por mas que este sistema eliminaría los errores propios de las valoraciones subjetivas, bien sea por el elevado costo del cronometro, bien porque el antes citado Abanico Roche se halla sumamente divulgado en todo el mundo, la cuestión es que aquel no se ha popularizado (13).

5.- Transmisión de salmonelosis al humano a través del huevo

La intoxicación por alimentos causada por *Salmonella enteritidis* después del consumo de huevos contaminados es un problema grande en salud pública (58), pues es un patógeno entérico capaz de producir síntomas clínicos en humanos (7).

La segunda guerra mundial destacó el peligro de los huevos secos- pulverizados, de los cuales casi 10% de las muestras se demostró que estaban contaminados (29), y a finales de la década de los 80's, se empezaron a acumular considerables evidencias epidemiológicas que indicaban que el contenido de huevo contaminado de huevos limpios e intactos originaba la transmisión de infecciones de *Salmonella enteritidis* a los humanos (1, 7,10).

Las investigaciones de las parvadas de postura implicaron a los huevos como el origen de los brotes en humanos, ya que se detectó que los aislamientos de S.

enteritidis eran del mismo tipo de fago que aquellas encontradas en humanos, con frecuencia con idénticos perfiles de plásmidos, muestras ambientales, muestras de tejido y huevos (10).

Los huevos contaminados internamente han sido implicados más a menudo que ningún otro vehículo alimenticio en la transmisión de enfermedad humana causada por Salmonella enteritidis, se considera que aproximadamente el 80% de los brotes de origen alimentario con un vehículo alimenticio conocido debido a Salmonella enteritidis está asociado con el huevo (12), principalmente cuando el huevo está crudo o mal cocido, ya sea solo o como componente de diferentes alimentos (1,22,23,25,21,34,49,60), por este motivo la Salmonella enteritidis sigue siendo motivo de gran preocupación para la industria de las ponedoras de huevos comerciales (17,58).

Se ha encontrado que los huevos contaminados de forma natural contienen muy pocas cantidades de S. enteritidis, no obstante la población de S. enteritidis en huevos puede expandirse a cantidades más peligrosas si se mantienen los huevos a temperaturas que permiten el crecimiento bacteriano. Pero la resistencia al calor de Salmonella enteritidis se puede aumentar por exposición previa a condiciones alcalinas, y disminuye con refrigeración previa. No obstante, las cepas *salmonellae* de varios serotipos son capaces de sobrevivir a los métodos de cocción para huevo que permiten que la yema quede líquida (10).

Los principales síntomas consisten en dolores abdominales, náusea, vómito y diarrea. Por lo común la salmonelosis tiene un curso benigno y la recuperación clínica sobreviene en 2 a 4 días.

La presentación en el hombre es muy común. La salmonelosis se presenta tanto en casos esporádicos como en estallidos, que afectan a una familia o a varios cientos y miles de personas de la población (1).

1 Diagnóstico en el hombre:

La confirmación del diagnóstico clínico de una gastroenteritis por Salmonella se hace por aislamiento del agente etiológico de las materias fecales del paciente, su tipificación serológica y, cuando fuere necesario, su tipificación por fagos y perfil de plásmidos. En los pocos casos de septicemia. El agente puede aislarse de la sangre durante la primera semana de la enfermedad, como también de las heces, en la segunda y tercera semana (1).

3.- Salmonelosis en aves

Las infecciones con bacterias del genero Salmonella provocan gran variedad de enfermedades agudas y crónicas en la industria avícola; de hecho, las aves afectadas representan uno de los reservorios más importantes de salmonelas que pueden ser transmitidas al hombre en la cadena alimenticia, con frecuencia las infecciones en pollos y pavos se caracterizan por la colonización sintomática del aparato intestinal, algunas veces con persistencia hasta el sacrificio, lo cual permite contaminación de los cadáveres (10).

Durante su viaje por el organismo Salmonella debe tolerar varias agresiones como el pH gástrico y los péptidos antimicrobianos segregados por los enterocitos. Durante este viaje se produce una interacción íntima entre la bacteria y las células hospedadoras mediante una serie de señales bioquímicas. Luego, durante la invasión, dentro de las células epiteliales y fagocíticas ocurren espectaculares procesos que involucran también numerosos procesos de inducción (56).

El ciclo de la infección en las aves se inicia con los huevos contaminados, ya sea en el cascarón o en la yema. Los huevos contaminados diseminan la infección en la incubadora; cuando los huevos eclosionan se infectan los pollitos recién nacidos y

muchos de los que no mueren pueden constituirse en portadores. Este es el mecanismo mas importante que opera en la infección entre las aves de corral. Otro vehículo de la infección pueden ser las raciones alimentarias contaminadas. El canibalismo y la ingestión de huevos contaminados contribuyen también a la transmisión de la infección.

Los serotipos que no son específicos de una especie se difunden con más facilidad de una especie animal a otra, y por su intermedio al hombre (1).

Es sabido que los pollos domésticos son muy sensibles a la invasión por patógenos entericos tales como la Salmonella durante la primer semana de vida (50), la presencia de este agente en las aves es un tema de interés debido a la asociación existente entre la presencia de la enfermedad en humanos y el consumo de carne y huevos (49), "salmonelosis" es un término usado para describir la infección con cualquier microorganismo del género Salmonella diferente de S. pullorum (pulorosis) o S.gallinarum (tifoidea de las aves). En algunos países dichas infecciones se nombran como paratifoideas de las aves mientras que en otros casos el nombre del serotipo concerniente es usado, por ejemplo, "infección por typhimurium" (29).

Las infecciones paratifoideas pueden originarse por cualquiera de las numerosas especies de Salmonella no adaptadas al hospedador. Pueden infectar de forma concomitante a un ave o aun grupo de varias especies (2), ciertos tipos particularmente S. typhimurium, la cual puede ser considerada como endémica, es responsables de aproximadamente 50% de los brotes registrados de salmonelosis en aves del Reino Unido (29), además de ser la más común, seguida de S. enteritidis y S.heidelberg, pero la incidencia de otras especies varía enormemente de acuerdo con la localización geográfica y el tipo de ave.

Todas las aves pueden ser sensibles y las infecciones son comunes en todas las especies de aves domésticas. Generalmente, la incidencia es mayor en los grupos de aves jóvenes (2). Dos peligros son importantes: la transmisión de la infección de aves a otros animales y al hombre y el posible aumento de la virulencia de estos

microorganismos en las aves (29), por tanto la importancia de la infección para la salud pública obliga a un control serio (2).

La fijación de un microbio patógeno a la superficie de su célula huésped es el primer paso durante la patogénesis de muchas enfermedades bacterianas (58). La invasión de células epiteliales intestinales por salmonelas, origina una serie de cambios patológicos que afectan al líquido intestinal y a la regulación de electrolitos; este proceso puede originar finalmente muerte celular, y por lo tanto producir y exacerbar la diarrea (10), Salmonella enteritidis por ser una bacteria intracelular facultativa se disemina por torrente sanguíneo ocasionando una infección sistémica del ave. Cuando la infección del hospedero se produce vía oral, es necesario que las salmonelas alcancen los capilares sanguíneos que irrigan las paredes intestinales para pasar a circulación sanguínea (3,59), sin embargo, en el tracto intestinal existen barreras inespecíficas de tipo anatómico y fisiológico que normalmente impiden que microorganismos patógenos penetren la mucosa o se establezcan en ella (3), en muchas aves infectadas, la invasión del aparato gastrointestinal resulta en la multiplicación de Salmonella en el tejido reticuloendotelial del hígado y bazo y la diseminación final para colonizar una variedad de tejidos internos (10). En aquellos brotes graves de infección por PT en aves recién incubadas, al desarrollarse con rapidez una septicemia, ésta puede causar elevada incidencia de mortalidad con pocas o ninguna lesión aparente. Cuando el curso de la enfermedad es más prolongado, es frecuente la enteritis grave acompañada de lesiones necróticas focales en la mucosa del intestino delgado y es común observar núcleos cecales con apariencia de queso. El bazo y el hígado se hinchan y congestionan con evidentes franjas hemorrágicas o focos necróticos. Algunas veces los riñones también aumentan de tamaño y se congestionan; en numerosas ocasiones se ha informado de perihepatitis y pericarditis fibrinopurulentas. En el saco vitelino se puede observar material de la yema sin absorberse. A veces se observan otras lesiones que incluyen hipopion, panoftalmítis, artritis purulenta, aerosaculítis, y onfalítis (10), en pollitos y pavitos, con frecuencia no hay síntomas pero cuando se presentan prácticamente no se

distinguen de los de la pulorosis, y en efecto, estos padecimientos pueden ser diferenciados definitivamente sólo mediante exámenes bacteriológicos (29).

Los signos típicos de la infección en pollitos y pavipollos incluyen somnolencia progresiva con los ojos cerrados, alas caídas y plumas erizadas; son frecuentes la anorexia y la emaciación. A las aves afectadas a menudo se les observa hacinadas cerca de las fuentes de calor. Es común observar diarrea acuosa profusa, lo que ocasiona deshidratación y pastosidad en el área de la cloaca; en ocasiones, también se ha relacionado ceguera y cojera con la infección (10).

6.1 Factores de infección huésped - *Salmonella*

Los resultados de la infección por *Salmonella enteritidis* en aves están influenciados por las características de susceptibilidad del huésped también como factores microbianos, y las condiciones ambientales tales como el pH y la temperatura han sido mostrados como influencia en la expresión de los factores potenciales de virulencia tales como flagelo, fimbria y proteínas de la membrana interna, el lipopolisacarido de la membrana externa, los pili, la citotoxina y la enterotoxina (1) de *Salmonella enteritidis*, el crecimiento de este organismo en tejidos de pollo ha sido reportado como un factor que afecta la expresión del flagelo, fimbria y los sistemas de absorción de hierro, y diversas propiedades fenotípicas de este agente, incluyendo el crecimiento a alta densidad celular, y la expresión de alta – masa – molecular de lipopolisacaridos han sido vinculadas con el huevo contaminado.

El comienzo de infección por *Salmonella* ocurre primeramente en las superficies mucosas, y una significativa respuesta inmune humoral ocurre dentro de esta región (53).

Las infecciones con *Salmonella* ocurren a menudo en el intestino grueso, debido probablemente a una baja motilidad, pH alcalino, y una ausencia general de enzimas digestivas (57).

El lipopolisacarido también contribuye a la resistencia de la pared celular bacteriana, para atacar y evitar la digestión por fagocitos del huésped. Por otra

parte, la pérdida de la capacidad para sintetizar el lipopolisacarido completo se ha relacionado con una pérdida de virulencia para *Salmonella enteritidis* en ratones.

La fijación de los microbios patógenos a la superficie de la célula huésped puede ser un paso esencial en la patogénesis (45); esta capacidad para adherirse a la célula se ha relacionado con fimbrias tipo 1 y con una hemoaglutinina resistente a la manosa (10), en ciertas instancias, la fijación de la bacteria a las células requiere de la presencia de proteínas adhesivas tales como fibronectina sobre la superficie de la célula. Ha sido demostrado que la interacción de un número de proteínas adhesivas a las células está mediado por secuencias de péptidos que contienen el motivo *arggly-asp* (58).

Los plásmidos son elementos extracromosómicos de ADN que con frecuencia se relacionan con patogenicidad de las bacterias.

Los plásmidos de pesos moleculares característicos; se han relacionado de manera directa con la virulencia de cierta cantidad de salmonelas, y se ha demostrado homología considerable entre los plásmidos relacionados con la virulencia de varios serotipos (10).

Diferentes estudios han reportado que el lipopolisacarido, flagelo y fimbria, proteínas de la membrana externa, y plásmido pueden contribuir a los eventos iniciales que son clave en la fijación de *Salmonella* al tocar el margen de las células epiteliales del tracto gastrointestinal (45).

Las diferencias antigénicas observadas en salmonelas son un reflejo de la composición genética de los genes flagelares y biosíntesis del locus del antígeno O (34).

Se señalan tres categorías generales de toxinas que intervienen en la patogenicidad de las salmonelas PT. La endotoxina se relaciona con la porción de lípido A de los lipopolisacaridos (LPS) de la pared celular de *Salmonella*; si se libera la endotoxina en la corriente sanguínea de un animal infectado cuando se lisan las células con bacterias, pueden causar fiebre (10).

6.2 Factores de infección por *Salmonella enteritidis* en aves

La *Salmonella* es una bacteria gram negativa que puede ser encontrada en aves o en su ambiente (49), y es reconocida mundialmente como una de las bacterias patógenas más importantes de las aves (18), los pollitos pueden ser fácilmente infectados con *S. enteritidis* por exposición a aerosoles contaminados (7,23) aunque las aves se vuelven menos susceptibles a las salmonelas durante la primera semana de vida (10). En la industria avícola la combinación de numerosas prácticas de manejo y las condiciones incontrolables del medio ambiente contribuyen a aumentar la condición de estrés en las aves, con el subsecuente aumento del potencial para la colonización por *Salmonella*, otros como el proceso de otra enfermedad (p. Ej., coccidiosis) (5,7,10), el clima, problemas de alimentación, el uso indiscriminado de antibióticos pueden incrementar potencialmente el nivel de mortalidad observado en un brote (7,10,61), así mismo, la infección por *Salmonella* puede incrementar la susceptibilidad de las aves a otros patógenos (10).

Milner y Shaffer (1952) observaron por primera vez que la colonización por *Salmonella* dependía de la dosis y variaba con la edad cuando ocurría un desafío. Ellos encontraron que pollitos de un día de edad podían ser colonizados con menos de cinco células de *Salmonella* mientras que más tarde la colonización era más irregular y requería dosis más altas para lograrlo. Estas observaciones han sido confirmadas por varios investigadores. Sadler *et al* (1964), encontraron que el nivel de contaminación intestinal medido por la eliminación fecal de *Salmonella* viable estaba relacionado con la edad del ave y con la dosis. Solamente el 8% de todas las aves inoculadas todavía eliminaban *Salmonella* al día 38, el 1% en el día 73 y solamente el 0.5% el día 94.

Una serie de estudios realizados en el centro de investigación avícola de Houghton, Gran Bretaña, demostraron que la terapia con antibióticos puede suprimir la infección por *Salmonella*, pero cuando el tratamiento se termina, las salmonelas

empiezan a reproducirse de nuevo y a menudo son eliminadas a niveles más altos a causa de la disminución en la competencia por la microflora autóctona del intestino (7).

La interrupción de la integridad fisiológica del intestino por la coccidia parece incrementar la susceptibilidad a la colonización por *Salmonella*. *Eimeria tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, pueden aumentar la capacidad de los serotipos de *Salmonella* como *Salmonella enteritidis*, para colonizar los aparatos intestinales de los pollos. Los mecanismos para este efecto pueden relacionarse con menos cantidad de ácidos volátiles inhibidores de *Salmonella* y mayor potencial de oxidoreducción en el intestino relacionado con la infección de coccidias (10).

Los factores que influyen la incidencia de *S. enteritidis* en casetas con gallinas ponedoras incluyen la contaminación inicial de pollos y pollonas, eficacia de desinfección y limpieza, presencia de roedores, edad de la parvada, raza de la parvada, presencia de moscas, ventilación y métodos de manejo en las instalaciones de postura, y estas varían por regiones (12).

6.3 Aves portadoras

Los signos están ausentes en aves portadoras y rara vez ocurren en pollos, patos o pavitos de más de tres semanas de edad (29), como el serotipo enteritidis es un problema grande en la crianza de pollos, porque la infección es muy insidiosa en estos animales ya que sus portadores son usualmente asintomáticos (60), y además el organismo se excreta por vía intestinal, y así el ambiente se contamina, y aún cuando los reactores se eliminan, portadores adicionales se establecen como resultado del contacto con un ambiente infectado(29), las gallinas infectadas con *S. enteritidis* pueden llevar el organismo en sus intestinos y eliminarlo en sus heces, que pueden contaminar la superficie del cascarón por el organismo durante el almacenaje y esto puede dirigir a la contaminación interna de los huevos (58).

En la forma subclínica, el animal puede tener una infección latente y albergar el patógeno en sus ganglios, o puede ser portador y eliminador del agente por las materias fecales, en forma transitoria, intermitente o persistente (1).

En un estudio, Gast (1993), encontró que solo 72.1% de gallinas que pusieron huevos contaminados fueron también halladas eliminadoras de *Salmonella enteritidis* en sus heces y solo 48.8 % de estas gallinas fueron identificadas como seropositivas (24).

6.4 Infección de órganos internos

La mayoría de los factores que afectan la susceptibilidad de pollos a colonización por salmonelas incluye edad, estrés, aditivos alimentarios, y genéticos. La coccidiosis también ha sido implicada en el incremento de índices de colonización y frecuencia de infecciones sistémicas en experimentos de laboratorio (5), la susceptibilidad para colonización intestinal, invasión de órganos y la deposición en huevos, han sido reportados con variantes entre líneas de pollos(19), Mc Dougald (1986) sugirió que las infecciones naturales pueden contribuir al nivel de colonización de *Salmonella* en pollos bajo condiciones practicas (5), la frecuencia de aislamiento de *Salmonella enteritidis* de órganos internos ha sido reportada durante las primeras semanas después de la infección experimental (24), Bjerrum (2003) recuperó *Salmonella* de bazo e hígado de los pollos de incubadora y los pollos mayores estudiados uno o dos días después de la exposición a *Salmonella*, la infección de otros órganos aparte del tracto intestinal fue observada al poco tiempo después de la infección (6), *Salmonella enteritidis* persiste en ciego y buches de pollos (60).

Después de la inoculación experimental oral de gallinas ponedoras, se ha aislado *S. enteritidis* de numerosos tejidos, abarcando hígado, bazo, sangre cardiaca y peritoneo. También se ha comunicado la diseminación de *Salmonella enteritidis* hacia diversos órganos internos, incluso ovarios y oviductos, después de la inoculación conjuntival o la exposición a aerosoles contaminados. Asimismo se ha

documentado el aislamiento de Salmonella enteritidis de gran variedad de órganos internos en aves infectadas de manera natural (10).

Okamura y cols.(2001), encontraron que Salmonella enteritidis ascendió de la cloaca a la vagina, colonizó la vagina, y resulto en un incremento de la producción de huevos contaminados,. Diferentes estudios se han concentrado sobre el papel que juega la infección ascendente de la cloaca a la vagina en la producción de huevos contaminados.

Las gallinas inoculadas intravaginalmente produjeron huevos contaminados a alta frecuencia sin reducción de producción de huevos. Salmonella enteritidis tiene una ventaja específica sobre otros serovariedades de Salmonella en su capacidad para colonizar los tejidos vaginales de gallinas, y esta alta afinidad de Salmonella enteritidis para la vagina puede jugar un papel significativo en la producción de huevos contaminados (45).

El gran numero de Salmonella enteritidis fijado al epitelio vaginal, más alto que el de otros serovares, sugiere que este organismo tiene la habilidad para fijarse al epitelio vaginal. Esto puede dirigir a la producción de huevos contaminados con Salmonella enteritidis, que es de interés significativo en la salud pública, debido a que Salmonella enteritidis es el serovar de Salmonella predominante que contamina huevos, se presume que posee una ventaja selectiva sobre otros serovares en su afinidad para los huevos puestos o el tracto reproductivo (45).

Antes de que Salmonella enteritidis ascienda de la cloaca a la vagina, necesita colonizar y proliferar en la cloaca. La alta afinidad de Salmonella enteritidis por la cloaca puede contribuir a la infección ascendente de la vagina desde la cloaca (45).

Salmonella enteritidis fue recuperada a altos niveles del ciego y cloaca en alguna ruta de inoculación, pero las gallinas inoculadas intracloacalmente no produjeron huevos con contenidos contaminados. Esto puede ser explicado por el hecho que, a la ovoposición, los huevos raramente tocan la pared cloacal contaminada porque la parte terminal de la vagina es prominente fuera de la cloaca.

Por lo tanto, las heces o cloaca parecen ser una fuente improbable de contaminación de huevo con Salmonella enteritidis, aunque fue altamente recuperada de la cloaca (45).

6.5 Eliminación fecal

La colonización intestinal persistente y la eliminación fecal por cepas de S. enteritidis han sido indicadores inconsistentes de la probabilidad de la invasión de órganos internos y asociados a la contaminación de huevo (1,22), en un estudio reciente Holt y colaboradores (2003) demostraron que las gallinas vacunadas con bacterinas de Salmonella enteritidis mostraron significativamente una reducción en la infección de órganos internos por el organismo después del desafío y algo reducida la eliminación fecal (33). Una baja frecuencia de aislamiento de un pasaje aislado de una muestra fecal después de tres semanas de la inoculación puede ser la consecuencia de una habilidad disminuida para persistir en el tracto intestinal (25).

Las parvadas con altos niveles de contaminación de estiércol tienen más probabilidades de producir huevos contaminados y, de este modo poner en riesgo mayor la salud humana (20)

6.6 Mortalidad en pollos

Con frecuencia se observa que la mortalidad relacionada con las infecciones PT naturales en las aves, llega a su máximo a los 3 a 7 días de edad (1,10). Las encuestas han demostrado que la frecuencia de infección por Salmonella es pollos es variable, pero cerca de 5% de los lotes examinados están infectados y el peligro potencial para la salud pública creado por estas infecciones no puede ser descuidado, la mortalidad varía ampliamente, desde pocas muertes hasta la mayor parte de los pollos incubados (22), pasando las dos primeras semanas de vida la mortalidad prácticamente se detiene (1,10).

Aunque la mortalidad por la infección de salmonelas endémicas como S. Typhimurium puede ser alta, los serotipos raros y exóticos producen aisladamente,

en general, baja mortalidad, frecuentemente menos de 2% y rara vez en pollos de más de tres semanas de edad (29).

En un estudio en Nueva Zelanda se observó alguna mortalidad temprana con lesiones en el hígado y en el intestino en aves que morían por salmonelosis (8).

7.- Transmisión vertical y horizontal a través del huevo

La importancia de infecciones por *Salmonella enteritidis* transmitidas verticalmente o adquiridas en las incubadora esta directamente relacionada al potencial de estas infecciones para persistir hasta que las pollitas afectadas maduran y comienzan a poner huevos (1, 10,27). La *Salmonella* tiene la habilidad para persistir en ambientes hostiles y puede ser transmitida de forma horizontal y vertical (49), y la circulación de aire es a menudo un factor importante en la transmisión y perpetuación de la infección por *Salmonella* en las parvadas de aves, esta transmisión horizontal aerógena de este agente ha sido observada en pollitos y gallinas ponedoras en una variedad de situaciones de alojamiento (23).

Durante los primeros días después de la incubación las infecciones por salmonelosis adquiridas de manera vertical de los padres, o de manera horizontal en la incubadora, pueden disminuir el crecimiento o incluso aumentar la mortalidad de los pollitos (10).

Los resultados de investigaciones de campo y experimentales han destacado la transmisión vertical como una ruta importante de infección para este serotipo en huevos y parvadas de broilers, haciendo la identificación de lotes paternos infectados particularmente importante (55).

Los portadores son capaces de pasar la bacteria a los huevos por las rutas transovarica y probablemente retrocecal, y a sus compañeros por diseminación de *Salmonella* en el ambiente por excreción intestinal (60), aunque las gallinas pueden albergar *Salmonella enteritidis*, no muestran signos de infección, y los huevos que producen parecen normales (20), y la contaminación de huevo por *Salmonella enteritidis* puede originar la transmisión vertical del organismo a pollitos y la

Por lo tanto, la posibilidad de transmisión ovárica de Salmonella enteritidis no puede ser descartada (45).

Algunos reportes enfatizan el papel del oviducto o cavidad peritoneal en la contaminación de los huevos en formación porque Salmonella enteritidis fue aislada de ambas partes y más frecuentemente de albúmina que de yema.

Estos datos pueden estar relacionados a la significativamente alta contaminación de los huevos con Salmonella enteritidis (45).

Los ovarios infectados de Salmonella enteritidis pueden resultar no solo en la postura de huevos contaminados, sino también los pollitos infectados pueden incubarse de esos huevos contaminados. Estas pollitas infectadas pueden crecer y ser pollonas y subsecuentemente poner huevos contaminados (58).

Las gallinas infectadas natural y artificialmente con Salmonella enteritidis pueden depositarla dentro de los huevos (22, 25, 58). Este depósito es aparentemente una consecuencia de la colonización de tejidos reproductivos en gallinas ponedoras infectadas sistémicamente (20,22,25,58), y tal vez dependiendo sobre que región del tracto reproductivo de la gallina infectada es colonizado, la S. enteritidis puede ser depositada en la yema o en la albúmina de los huevos en que se desarrolla, especialmente el ovario y el oviducto anterior, en pollas sistémicamente infectadas (22, 25) Gast y Beard (1990 y 1992 respectivamente) reportaron que Salmonella enteritidis puede ser aislada de las membranas del vítelo del huevo pero no del vítelo de los huevos puestos por gallinas experimentalmente infectadas. Es posible que durante la transmisión transovarica, S. enteritidis permanezca unida a las membranas del vítelo del huevo y puede ser más frecuentemente aislada de esta parte del huevo (58), sin embargo se han reportado bajas frecuencias de contaminación de huevo puesto por gallinas con relativamente altas incidencias de colonización de ovario (25). Gast y Beard (1990) encontraron más S. enteritidis en el contenido que en el cascarón y membranas de huevos de gallinas experimentalmente infectadas, pero esta diferencia se debe presumiblemente a la

transmisión transovarica de S. enteritidis en las gallinas infectadas, un proceso que no es generalmente aceptado para otras salmonelas (11), además tiene la capacidad para multiplicarse extremadamente más rápido ayudada por altas temperaturas en la yema más que en la albúmina (12).

Salmonella enteritidis puede invadir y pasar a través de las paredes del folículo y entrar en la yema. Alternativamente, puede atacar a ciertos componentes de la pared folicular lo cual le permite ser llevada dentro del oviducto siguiendo la ovulación. Para que ocurra la transmisión transovarica, la bacteria tiene que interactuar con los componentes celulares del folículo preovulatorio de la polla. Es posible que la contaminación por Salmonella enteritidis in vivo a la yema por invasión a las células de la granulosa, resida en este sitio, y cuando el folículo estigma y rompe durante la ovulación algunas de las células de la granulosa que llevan el organismo puedan desprenderse y caer resultando en la contaminación del huevo (58).

La contaminación de huevo no necesariamente puede estar relacionada directamente con la dosis de infección de S. enteritidis, y la disponibilidad de un número considerable de huevos contaminados puestos por gallinas infectadas es esencial para determinar las frecuencias en que es depositada en diferentes partes dentro del huevo (12), sin embargo la detección eficiente de huevo contaminado es complicada por los pequeños números iniciales de células de Salmonella enteritidis encontrados típicamente en huevos recientemente puestos por gallinas infectadas natural o artificialmente (22,25), pero Gordon y Tucker (1965) señalaron que con largos periodos de almacenamiento se incrementan los niveles de recuperación de yema y clara.

Diferentes proteínas en la clara tienen propiedades antibacterianas, y el pH es desfavorable al crecimiento de las bacterias, de acuerdo a Romanoff y Romanoff (14), la bacteria puede penetrar un huevo hasta la clara, y multiplicarse por un corto tiempo, pero entonces es rápidamente reducida en número (11).

En un estudio de Thiagarajan y Cols. (1994), después de las inoculaciones orales de aves ponedoras, la Salmonella enteritidis, pudo ser aislada de las membranas de los folículos preovulatorios durante las primeras semanas de la infección. Encontraron también que el organismo se adhirió predominantemente a las células de la granulosa con poca o ninguna adhesión a las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, estas conclusiones sugieren que las células de la granulosa del ovario de gallina tienen una diversidad de estructuras de superficie que median la expresión de los diferentes patrones de adhesión para los aislados de Salmonella enteritidis, reportes previos han sugerido la posibilidad de contaminación de yema en vivo a través de una diseminación hematogena por colonización del organismo en el peritoneo (58).

8.1 Porcentajes de contaminación de huevo

La incidencia anual estimada de enfermedades de origen alimentario asociadas con Salmonella está en el rango de 1 a 4 millones de casos en Estados Unidos (15,49), Salmonella enterica serotipo enteritidis es el serotipo más frecuentemente aislado durante la salmonelosis (33%), y este serotipo es aislado de 72% de los productos de ave contaminados en Francia (60), aunque la frecuencia observada de aislamiento de Salmonella enteritidis de huevos puestos por gallinas ponedoras comerciales naturalmente infectadas ha sido tan baja como 0.03% en la mayoría de los estudios (22, 24, 25).

Las frecuencias relativamente bajas de contaminación de huevo han sido reportadas en la mayoría de estudios de infección experimental, incluso después de la administración de dosis extremadamente grandes de Salmonella enteritidis (25), la incidencia de depósito de Salmonella enteritidis en huevos de lotes de ponedoras comerciales en los Estados Unidos parece ser muy baja (1, 10,22).

El rango de contaminación de huevo con Salmonella enteritidis es esporádico y es estimado entre 1 y 11 huevos contaminados por cada 100,000 huevos puestos

8.3 Pelecha forzada

La pelecha inducida es un procedimiento usado por la industria de la postura para extender el rendimiento de la parvada. Los métodos usados para inducir una pelecha varían pero la restricción de alimento, restricción de agua, y alteración del fotoperiodo son los métodos de elección. Después de una pelecha inducida las gallinas muestran incremento de la productividad, mejor conversión de alimento, y se reduce la mortalidad (31).

El porcentaje de parvadas pelechadas anualmente en los Estados Unidos está entre el 75 y 80%, que representan un número sustancial de gallinas expuestas a este procedimiento (33), se ha demostrado que induciendo a pelecha gallinas viejas usando el protocolo de remoción de alimento por catorce días exacerba una infección intestinal por *Salmonella enteritidis*, y también que las gallinas ya infectadas con el microorganismo durante el periodo de remoción de alimento han tenido infecciones intestinales más severas que las gallinas sin pelechar, y esto ocurre en aves de diferentes edades(10,31).

Estudios han demostrado que la pelecha inducida reduce la respuesta celular inmune, y que este procedimiento incrementa la severidad de una infección intestinal por *Salmonella enteritidis*, y existe la posibilidad de que el incremento puede ser un reflejo de la edad individual de las aves.

La pelecha en combinación con una infección por *Salmonella enteritidis* crea un verdadero estado de enfermedad en el tracto alimenticio de las gallinas afectadas mientras que, bajo condiciones normales, poca morbilidad sucedió en aves adultas con *Salmonella enteritidis* inducida (31).

Las gallinas pelechadas tienen significativamente más inflamación intestinal, eliminan significativamente más *Salmonella enteritidis* del tracto alimenticio, y transmiten significativamente más *Salmonella enteritidis* a aves sanas al contacto – exposición que las gallinas sin pelechar (20,31,32, 33), y la gran cantidad de

Salmonella enteritidis que puede ser eliminada dentro del ambiente de la caseta durante una pelecha, puede plantear un gran problema para el productor y para futuros lotes que deberán ocupar esas casetas (31,32)

El incremento de transmisibilidad puede ser debido al incremento en el número de Salmonella enteritidis eliminada por las gallinas pelechadas infectadas y la susceptibilidad incrementada observada de gallinas pelechadas a una infección por Salmonella enteritidis (31,32), el equipo de valoración de riesgo de Salmonella enteritidis del servicio de inspección de salud animal y vegetal designó a la inducción de pelecha a través de la restricción de alimento como un factor de riesgo para la producción de huevos contaminados con este agente (27, 33).

Las gallinas alimentadas con baja energía, alimentos bajos en calcio para inducir una pelecha mostraron niveles de Salmonella enteritidis significativamente reducidos comparados con las gallinas ayunadas (33), por ejemplo en un estudio de Holt y Porter (1993) las gallinas desafiadas con Salmonella enteritidis durante el periodo de remoción de alimento generalmente eliminaron significativamente más Salmonella enteritidis que gallinas sin pelechar durante el periodo de remoción de alimento (31,32), pero la colonización intestinal persistente y la eliminación fecal de Salmonella enteritidis no han sido indicadores particularmente consistentes de la probabilidad de infección sistémica y contaminación de huevo (25), un proyecto piloto encontró que el porcentaje de huevos conteniendo Salmonella enteritidis se incrementó las primeras cinco semanas después de la pelecha.

La administración de antibióticos después del periodo de restricción de alimento, en combinación con la administración oral de cultivos probióticos, disminuyó significativamente los niveles de Salmonella enteritidis en las gallinas pelechadas (33).

9.- Inmunidad

Salmonella enteritidis persiste por cuatro semanas después de la inoculación sólo en el tracto intestinal, coincidiendo con el desarrollo de niveles humorales de anticuerpos detectables en la mayoría de pollos muestreados. (Holt y Gast, 1997). Sin embargo ni la maduración inmunológica ni la adquisición de diversa microflora intestinal ha desalojado de forma evidente la Salmonella enteritidis de los sacos ciegos (27), las IgA a veces evitan la adhesión de las salmonelas al epitelio intestinal (37), se han encontrado elevados títulos de IgG en gallinas ponedoras, por lo menos 27 semanas después de la inoculación oral experimental (10), varios estudios han demostrado que la inmunidad mediada por células es significativamente deprimida por el proceso de pelecha mientras que la inmunidad humoral no es afectada (31,32).

Algunos estudios han descrito el efecto inmunomodulador de sobrenadantes crudos de linfocina en pollos de engorda y pollitas tipo Leghorn ante desafíos homólogos. Por ejemplo, la administración profiláctica de linfocinas obtenidas de pollos inmunizados con Salmonella enteritidis reduce la invasión a órganos por esta bacteria.

Es posible inducir resistencia en aves mediante extractos crudos de linfocinas dirigidas hacia un microorganismo en específico; se ha observado que esta resistencia se encuentra asociada con una importante participación de heterofilos en la resolución de la infección.

Si la actividad de los heterofilos constituye el principal mecanismo inespecífico de defensa contra Salmonella enteritidis, su participación podría ser modulada por linfocinas procedentes de aves inmunizadas con microorganismos de géneros distintos (3).

Los anticuerpos contra Salmonella enteritidis se han encontrado en las yemas de huevos puestos por aquellas gallinas infectadas. Se encontraron anticuerpos específicos a los nueve días posinoculación en huevos de gallinas infectadas de

manera experimental. Aunque también se han encontrado anticuerpos en huevos de gallinas infectadas de manera natural (10).

La inmunoglobulina (Ig) predominante de la inmunidad de la mucosa es la IgA aunque respuestas por IgG y/o IgM también pueden ser observadas. La IgA puede ser encontrada en la bilis y secreciones de la mucosa y puede existir en formas monoméricas y multimericas.

El anticuerpo IgA intestinal previene la adherencia de la bacteria a las células de la mucosa en los estados tempranos de infección. Y una vez que el patógeno entra al tejido, las respuestas inmunes sistémicas ayudan en la eliminación del patógeno de tejido y órganos (40)

Las inmunoglobulinas secretoras A (sIgAs), muestran diversidad excepcional en su habilidad para mediar protección a las superficies mucosas. En pollos, respuestas inmunes sólidas en la mucosa pueden ser observadas dentro de las 2-3 semanas después del desafío contra flagelo, lipopolisacaridos, o proteínas de la membrana interna en el intestino o bilis, indicando esas, al menos en especies aviares, la inmunidad de la mucosa es capaz de responder a una variedad de determinantes de Salmonella (53).

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) también son importantes en la inmunidad inespecífica del hospedero contra infecciones por Salmonella debido a las siguientes razones: a) la invasión de la mucosa intestinal por Salmonella propicia el reclutamiento de grandes cantidades de PMN al sitio de infección o inflamación en la lamina propia; b) pollos granulocitopenicos con bajo numero de PMN circulantes en la sangre son más susceptibles a la infección por Salmonella; y c) estudios *in vitro* han demostrado que los leucocitos PMN pueden fagocitar eficientemente bacterias del genero Salmonella (3).

Un componente importante de la inmunidad mediada por células involucra la acción de las citocinas, secretadas por las células T específicas al antígeno, sobre las células efectoras, las citocinas son productos solubles generados por células que controlan la respuesta inmune, son responsables para la futura proliferación,

diferenciación y activación de las células involucradas en la inmunidad mediada por células, resultando en el incremento en la resistencia a las bacterias. Diferentes investigadores han documentado el incremento de la resistencia causada por administración exógena de citocinas derivadas de macrófagos, linfocinas, o su combinación contra bacterias intracelulares facultativas incluyendo la *Salmonella* (3, 10,42). Los anticuerpos circulantes O y Vi se relacionan con resistencia a la infección y a la enfermedad. Sin embargo, pueden ocurrir recaídas en 2 a 3 semanas después de la recuperación a pesar de las anticuerpos (37).

En general, la inmunidad humoral contribuye a la eliminación de *Salmonella enteritidis* en pollos, y la respuesta de IgA intestinal aparece más efectivamente que las respuestas humorales sistémicas en el tracto gastrointestinal (40).

En pollos infectados con *Salmonella enteritidis*, la IgA dirigida contra antígenos de *Salmonella enteritidis* puede ser encontrada en ambas secreciones; mucosas y bilis.

El ciego es el primer ambiente gastrointestinal enfrentado por la *Salmonella enteritidis* en aves, y estas respuestas inmunes presentes en esta región pueden afectar la sobrevivencia y virulencia de *Salmonella enteritidis*.

La activación de un antígeno específico del sistema intestinal es importante para la protección de polos de patógenos en el tracto intestinal (53).

Los fluidos biliares e intestinales han sido usados rutinariamente como indicador de la inmunidad de la mucosa en aves. Las IgA del ciego pueden realizar también una función similar en pollos, si es para rastrear la inmunidad después de la infección o como un indicador de la eficacia de una vacuna. Sin embargo todos los métodos, fluido intestinal, bilis, y ciego, requieren eutanasia del animal (53).

10.- Métodos de identificación:

Las cepas recibidas para su caracterización son aisladas en medio nutritivo y con un cultivo puro se confirma su identificación por las pruebas bioquímicas habituales para el género. Se les realiza triple azúcar hierro, fenilalanina, urea, Voges Proskauer, gelatina, lisina, arginina y ornitina de Moeller, manitol, maltosa, sorbitol, dulcitol, adonitol, salicina. Con un cultivo en agar tripticasa soya en tubo inclinado se

investigan los antígenos somáticos por aglutinación en lámina, con gérmenes viables. Primero los antígenos determinantes de grupo y luego de establecido éste, los antígenos menores. En general se sigue un criterio de conveniencia, que resulta de probar en primer término los grupos mas frecuentemente aislados: O:4; O: 6, 7,8; O: 9; sino se obtuviera una aglutinación positiva en esta primera etapa, se sigue con los antígenos somáticos de grupos menos frecuentes. Luego de establecida la fórmula somática se investigan los antígenos flagelares. Para ello se cultiva la cepa problema en placas de Sven-Gard. Se trata de un agar nutritivo semisólido, que consiste en caldo nutritivo con el agregado de 7 gramos por litro de agar, en placa de Petri que sin ser invertidas, se siembran con asa bacteriológica con un punto en el centro de la placa y se incuban 24 horas a 35°C. Las bacterias móviles se desarrollan extendiéndose sobre toda la superficie del medio. La aglutinación se realiza también en placa, con los cultivos bacterianos recogidos de la superficie y de zonas alejadas de la zona central donde se sembró. Nuevamente se sigue un criterio de conveniencia, buscando primero los antígenos flagelares de los serotipos mas frecuentes pertenecientes a ese grupo somático. En un cultivo puro, la población de bacterias presente puede no estar expresando las dos fases flagelares mencionadas, por lo que frecuentemente debe realizarse una inversión de fases. Nuevamente se recurre a las placas de Sven-Gard, pero esta vez con el agregado de una gota incluida de suero hiperinmune contra la fase que la bacteria ya expresó. De esta manera, al verse la movilidad favorecida por el medio semisólido, la población bacteriana deberá expresar la otra fase que no está inhibida por el suero hiperinmune y por aglutinación en lámina podrán detectarse estos antígenos expresados. Cuando se quiere demostrar la incapacidad de una bacteria de expresar otra fase, o cuando estamos frente a una bacteria aparentemente inmóvil, o cuando no fue suficiente la placa de Sven-Gard para lograr la inducción de la otra fase de antígenos flagelares, se recurre a los tubos en "U". Estos tubos, que son finas varillas de vidrio a las que les ha dado la forma de una "U", pueden inducir la aparición de fases flagelares no bien expresadas anteriormente. La bacteria es sembrada en una rama del tubo y, si expresa movilidad, es recogida en la otra rama del tubo 24 o 48 horas después de una incubación a 35°C. Una vez recogida, se la

reporto 7.1% de prevalencia de Salmonella enteritidis en el ambiente de las casetas de parvadas de ponedoras comerciales en los Estados Unidos.

La probabilidad de recoger la bacteria del aire puede depender de la sensibilidad, del método de la prueba seleccionada y la concentración de bacterias circulando en el aire y al sitio de colección de la muestra, este muestreo no ha sido una característica común de los programas de verificación para aves comerciales, pero la documentación experimental de la transmisión de la infección de Salmonella enteritidis en el aire sugiere que este patógeno es fácilmente encontrado circulando en el aire de las casetas contaminadas y puede permitir la diseminación aerógena generalizada del patógeno a través del polvo y aerosoles contaminados (10,23) y puede ofrecer una oportunidad para identificar eficientemente las parvadas infectadas por colección y análisis de muestras de aire (23,49), la realización de muestras en el aire puede ser una alternativa eficiente y accesible para detectar la Salmonella enteritidis en el ambiente de las casetas avícolas, la exposición pasiva de placas de agar es el método más comúnmente usado para detectar bacterias patógenas en el aire, pero este método es relativamente insensible a menos que sean usados largos intervalos de exposición (23), una nueva ayuda en la reducción de Salmonella es disminuyendo el nivel de polvo aerógeno y bacteria en el ambiente de las aves, por tanto se reduce la transmisión vertical (49), la habilidad de las cargas electrostáticas para atraer y agarrar las bacterias que lleva el aire en las partículas de materia es importante para el éxito de esta tecnología como una estrategia de control para reducir los niveles de patógenos en el ambiente (23), por tanto el uso de ionización negativa puede ser un método de reducción de los altos niveles de polvo y bacterias en las instalaciones de confinamiento, los generadores de iones negativos han reducido significativamente los niveles de polvo aerógeno en cuartos de postura, cabinas de incubadoras, y las instalaciones de confinamiento crianza de reproductoras pesadas (23,49).

El sistema de carga aérea electrostática ha sido asociado con un 64% de reducción en bacterias Gram negativas durante la crianza de pollonas reproductoras

pesadas (49), el número y ubicación de las muestras de aire necesarias para una detección congruente de *Salmonella enteritidis* en una caseta de aves de talla y escala comercial aun son desconocidos.

En un estudio comparativo, la exposición pasiva de placas de agar fue más sensible que las muestras de impacto para detectar *Salmonella* en muestras de aire de una cabina de incubadora de pollo pesado, y también a través de comparaciones significativas estadísticamente entre las muestras electrostáticas y de impacto fueron hechas difíciles por el pequeño número de muestras de impacto colectadas, las muestras de impacto no fueron demostrablemente superiores al mecanismo electrostático para recuperar cualquier colonia bacterial total sobre agar MAC o colonias de *Salmonella* sobre agar BG (23).

10.3 ELISA:

Comparada con la examinación bacteriológica convencional y las pruebas de aglutinación la prueba de ELISA tiene un número de ventajas para la detección serológica de infecciones de *Salmonella enteritidis* en aves, incluyendo fácil operación, conveniencia para la selección a gran escala, sensibilidad, y especificidad (63).

La detección bacteriológica de *Salmonella* en parvadas de aves puede ser difícil debido a una baja prevalencia y la presencia de animales portadores mostrando excreción intermitente, o sin excreción de la bacteria. Para superar estos problemas, varios investigadores han evaluado el uso de métodos basados en ELISA con diferentes antígenos y materiales de muestreo (55).

Para los análisis ELISA, se utilizan anticuerpos monoclonales contra las proteínas de la membrana externa o de los flagelos, en particular para detectar *Salmonella enteritidis* en huevos, tejidos, y muestras ambientales. Aunque en apariencia no resultan tan sensibles como los métodos de cultivo convencionales, se menciona que las pruebas de ELISA detectan salmonelas a una frecuencia comparable con los métodos estándar, y lo logran por lo menos en un día menos. Sin embargo, en

general son necesarios uno o dos pasos de cultivo en enriquecimiento iniciales para permitir la expansión de la población de salmonelas al grado que pueda ser detectada por las pruebas de ELISA, lo que con frecuencia se estima entre 10^9 y 10^7 salmonelas /mL (10).

La prueba de aglutinación en placa de *Salmonella pullorum* usada en general ha sido adaptada para el uso con *Salmonella enteritidis* sin embargo, los sistemas basados en aglutinación han resultado menos sensibles que las pruebas de ELISA, y las dificultades técnicas en el uso de estas pruebas y las dificultades prácticas en proyección a gran escala tienen más peso que algunos de sus avances potenciales.

Reacciones cruzadas entre diferentes serotipos de *Salmonella*, especialmente grupos B y D, fueron observadas en pruebas de ELISA basadas sobre todos los antígenos flagelares. Estas reacciones cruzadas pueden ser atribuidas a epitopos comunes presentes sobre diferentes flagelinas.

La utilidad del uso del gen que modifica la flagelina como antígeno diagnóstico en ELISA ha sido reportada con anterioridad. La ventaja de este antígeno es que no es compartido por otras salmonelas invasivas en pollos y es encontrado solo en muy pocos serotipos de *Salmonella* de aves, tales como *asagona*, *derby*, *menston*, y *montevideo*, que generalmente solo causan infecciones intestinales pasajeras.

Las proteínas recombinantes de alta pureza no son aceptadas en general como reagentes para serodiagnóstico de muchas enfermedades bacterianas importantes. Las pruebas basadas en proteínas recombinantes proporcionan una herramienta simple, altamente sensible, no infecciosa e indispensable para la detección de anticuerpos (63).

Al igual que los cultivos convencionales, las pruebas de ELISA también tienden a dar resultados falsos positivos por flora competitiva capaz de crecer en los medios de enriquecimiento (10).

11.- Métodos de control

La Unión Europea ha establecido un sistema de etiquetado y marcado que informa al consumidor sobre los huevos que adquiere, su forma de producción y origen. Ello

supone implantar un sistema de identificación de granjas, marcado individual de los huevos y etiquetado que asegura y garantiza la trazabilidad del huevo desde su origen. La Unión Europea ha establecido un sistema de etiquetado y marcado que informa al consumidor sobre los huevos que adquiere, su forma de producción y origen. Ello supone implantar un sistema de identificación de granjas, marcado individual de los huevos y etiquetado que asegura y garantiza la trazabilidad del huevo desde su origen.

La trazabilidad se define como la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento o bien una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos, o con probabilidad de serlo.

La finalidad de la trazabilidad es aportar credibilidad y eficacia al sistema de control de la inocuidad de los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria, a través de información relevante asociada a la producción y comercialización de un producto alimenticio.

De esta forma, si aparece un problema se dispone de información suficiente para localizarlo dentro de la cadena alimentaria, identificar las causas que lo motivaron y adoptar las medidas correctoras (4).

El control de infecciones de *Salmonella enteritidis* en parvadas de ponedoras se ha convertido en la piedra angular de la mayoría de las estrategias propuestas para reducir el riesgo de la transmisión de la enfermedad en el humano asociada con el huevo (1,7,16,17,19), los esfuerzos para detectar y controlar la infección en aves jóvenes puede tener relevancia directa para la meta de reducir la contaminación de huevo (1,21), para esto diferentes medidas han sido probadas, incluyendo vacunación, terapia con antibióticos, y exclusión competitiva. Sin embargo, ninguno de estos métodos es completamente efectivo (1, 7, 10,60).

La detección temprana de *Salmonella enteritidis* en la parvada puede ser decisiva para prevenir la posible contaminación de huevo. Las muestras ambientales son actualmente en general el método más usado para determinar el nivel de

contaminación de la parvada. Sin embargo, se dificulta para correlacionar una muestra positiva de ambiente con la infección individual de aves. El cultivo de Salmonella enteritidis de huevos es el único método para probar directamente las gallinas que están poniendo huevos contaminados. Sin embargo, la producción de huevos positivos a Salmonella enteritidis es extremadamente baja en las parvadas afectadas; por lo tanto las pruebas individuales de huevos al nivel de producción no han sido bien aceptadas como un método para determinar el nivel de infección de las parvadas (53).

Diferentes métodos para monitorear la Salmonella en granjas avícolas han sido usados. El cultivo ambiental de Salmonella en granjas avícolas es una herramienta usual para asegurar la carga de Salmonella enteritidis, indirectamente para monitorear la infección de la parvada (38).

Pero los esfuerzos por establecer puntos de control clave para prevenir las infecciones por salmonelas en aves, se desvanecen por la diversidad de fuentes a partir de las cuales se pueden introducir las salmonelas a las parvadas o las casetas. Los programas de prevención y control efectivos, por tanto, deben incluir ataques coordinados y simultáneos al problema desde varias direcciones (10).

Todas las medidas de control para reducir la contaminación cruzada de salmonelas durante la incubación no pueden ser efectivas sin más conocimiento acerca de la sobre vivencia y crecimiento en los huevos fértiles (11), estas medidas de control incluyen despoblación de parvadas reproductoras infectadas, limpieza y desinfección de naves de pollonas y ponedoras, extensivos y mejorados programas de control de roedores, uso de productos de exclusión competitiva, vacunación, y correcto manejo y refrigeración de huevos, y a pesar de todos estos esfuerzos de control algunos galpones de ponedoras continúan siendo positivos a Salmonella enteritidis (1,10,17).

El uso de aisladores permite una fácil y más minuciosa limpieza y desinfección, evitando de este modo la propagación de la bacteria entre grupos y la

contaminación del ambiente (9), el número de pollitos contaminados con Salmonella en incubadoras comerciales puede reducirse, incluso si la Salmonella no es totalmente eliminada de cada huevo, si el químico u otros tratamientos pueden ser encontrados para reducir el número de células bacterianas entre el cascarón y sus membranas (11).

Las medidas profilácticas para incrementar la resistencia de las aves a infecciones con salmonelas son un componente de los complejos programas para el control de estos agentes zoonóticos. La exclusión competitiva (CE) y la inmunización con vacunas de Salmonella vivas e inactivadas son los métodos más importantes (43).

Las medidas de control tales como prácticas de bioseguridad, limpieza, y desinfección de instalaciones, programas de control de roedores, vacunaciones, y pruebas, aumentan los costos de producción. Incluso la publicidad general por los medios de comunicación acerca de la contaminación por Salmonella en ciertos alimentos particulares, puede afectar la demanda del consumidor por estos productos y, por tanto, afectar por último la rentabilidad para los productores (10).

El muestreo de tejidos de ave puede ser una medida alternativa para monitorear la infección actual, pero requiere eutanazar grandes cantidades de pollos y es todavía un indicador indirecto de la infección de Salmonella enteritidis (53).

Para asegurar la calidad del producto avícola, la industria debe adoptar un programa de control de calidad en el ámbito nacional (15).

Una parvada debe ser muestreada al menos dos veces antes de ser confirmada como infectada por Salmonella (55).

11.1 Vacunación

La vacunación ha sido una herramienta importante usada por la industria avícola para proteger las parvadas contra una variedad de agentes infecciosos, incluyendo Salmonella enteritidis (1,33), están en uso dos clases de vacunas: a) bacterinas y b) vacunas vivas atenuadas (1). Pero el problema con la estrategia de las vacunas es

que es difícil de encontrar un antígeno común para la diversidad tan amplia de *Salmonella* que comúnmente se encuentra en los pollos. Además, la *Salmonella* establece una relación de comensal en el intestino (7).

Recientemente la vacunación ha sido propuesta como una herramienta adicional en el control de *Salmonella enteritidis* en aves basada sobre los resultados de los experimentos sobre la eficacia de vacunas de *Salmonella* vivas y atenuadas, además de la eficacia, la seguridad de la vacuna también es importante, también como el efecto de programas de vacunación sobre el comportamiento de las pruebas sexológicas que juegan un papel importante en los programas de control de *Salmonella* en los países bajos (19).

La vacunación oral a aves a través del agua de bebida o alimento o por aspersión puede ser una ruta ideal para distribuir vacunas. Convencionalmente las vacunas muertas administradas parenteralmente inducen inadecuada respuesta local de IgA. Por lo tanto, las vacunas muertas de *Salmonella enteritidis* son ineficaces en el control de la colonización intestinal por el patógeno (40).

El uso de vacunación como medida de protección a la parvada ha recibido atención especial a través de los años. La elección del uso del organismo vivo vs. Una preparación muerta está influenciada por los factores positivos y negativos de cada una. Sin embargo, la masa de introducción de una vacuna viva tiene que ser comparada con la inducción potencial, al menos en el caso de las vacunas de *Salmonella paratifoidea*, de un potencial patógeno humano en los animales usados eventualmente para el consumo humano (53).

La administración de vacunas vivas de *Salmonella* a pollos de un día de edad puede también inducir una exclusión o inhibición de efectos contra otras salmonelas en cuestión de horas, una alta colonización y persistencia de la vacuna viva son requeridas para inducción de un efecto de exclusión entre cepas de *Salmonella* y también para inducir una adecuada respuesta inmune (43).

Las vacunas vivas atenuadas se han producido por dos métodos diferentes:

a). atenuación por métodos convencionales.

Básicamente las vacunas vivas atenuadas han sido preparadas a partir de las cepas rugosa y suave de Salmonella gallinarum. Que es el agente causal de tifoidea aviar y no se cree que sea patógena para los humanos.

b). atenuación por modificaciones genéticas.

Fue en 1981 cuando Hoseith y Stocker emplearon la mutación genética por medio del transposón para producir una cepa atenuada de S. typhimurium.

El transposón no es otra cosa que una porción de ADN que tiene la capacidad de moverse de un ácido nucleico a otro, insertándose al azar en moléculas de ADN y causando pérdida de la función cuando se insertan en un gen determinado (6).

Las vacunas vivas estimulan una mayor respuesta inmunitaria mediada por células que las bacterinas, que sobre todo promueven una respuesta humoral poco o nada relacionada con la protección. La vía de administración oral (ya sea bacterinas o vacunas vivas) tiene la ventaja de que origina la inmunidad local del intestino y reduce la eliminación de salmonelas por las materias fecales. La administración de vacunas vivas por vía parenteral puede producir ocasionalmente reacciones adversas por endotoxinas (1). Las vacunas atenuadas necesitan persistir en los tejidos lo suficiente como para inducir una respuesta inmunitaria protectora, pero deben ser avirulentas y eliminarse fácilmente de las aves vacunadas. Se han probado las cepas vacunales de *Salmonella paratyphoidea*, atenuadas por varios métodos diferentes, en cuanto a su eficacia protectora en aves (10).

Resultados estadísticos proveen fuerte evidencia que la vacunación con una vacuna basada en una cepa atenuada SG 9R contribuye a la reducción de *Salmonella enteritidis* en ponedoras (19).

La vacunación es uno de los métodos más efectivos en el control de este patógeno. A causa del creciente interés sobre la seguridad de las vacunas vivas modificadas, las vacunas muertas juegan un papel importante en la vacunación contra el patógeno.

Extensos estudios han revelado varios grados de protección obtenidos por vacunas muertas contra la invasión del patógeno dentro de los órganos internos.

Sin embargo se requieren dosis múltiples de vacunas muertas para mantener un adecuado nivel y duración de inmunidad, que es costoso e inconveniente.

El desarrollo de vacunas de dosis simple por microencapsulación de antígeno en polímeros biodegradables ha sido investigado recientemente. Una dosis simple de microesferas cargadas de antígeno ha inducido respuestas de anticuerpos equivalentes a las obtenidas con múltiples dosis de vacunas convencionales, los antígenos encapsulados son liberados de las microesferas en una forma continua y controlada, concomitantemente estimulando el sistema inmune. Además, las microesferas también proveen una barrera para proteger los antígenos encapsulados de la degradación por factores adversos tales como solventes orgánicos, bajo y alto pH; y proteasa, facilitando de este modo la retención y presentación del antígeno.

Aparte de las respuestas inmunes humorales incluyendo las inmunoglobulinas sistémicas IgG, IgM, y las respuestas locales mucosas IgA, las vacunas con microesferas han sido capaces también de inducir respuestas inmunes mediadas por células, lo cual es particularmente requerido para la lisis de las células infectadas por el patógeno y eliminación de patógenos intracelulares tales como *Salmonella enteritidis*.

Las respuestas de anticuerpos específicas resultantes IgG e IgA en los pollos vacunados sugieren que el antígeno de *Salmonella enteritidis* atrapado en microesferas puede provocar respuestas inmunes durante el procesamiento en el músculo y el aparato gastrointestinal de los pollos, la respuesta de anticuerpos fue detectada tan temprano como 2-3 semanas posvacunación, la liberación inicial del antígeno *in vivo* probablemente ocurrió en una manera similar a la observada *in vitro*. Esto es esencial de acuerdo a la inmunidad temprana establecida. El nivel de anticuerpos permanece persistentemente alto y esto probablemente es el resultado de la estimulación del antígeno debido a la liberación constante de las microesferas encapsuladas después de la liberación inicial.

Interesantemente, un segundo pico de respuesta de IgG fue detectado en todos los pollos vacunados sobre las semanas 17-20 posvacunación que posiblemente resultó de otro antígeno liberado de las microesferas erosionadas o rotas. Además

una simple dosis de microesferas cargadas de Salmonella enteritidis indujó alta y larga respuesta de IgG que aquella de Salmonella enteritidis emulsificada en aceite, reflejando los avances del antígeno encapsulado en microesferas.

Para microesferas de uso oral, solo partículas pequeñas como diez micras pueden ser llevadas por las placas de péller y, subsecuentemente, estimular respuestas inmunes.

La vacunación contra Salmonella enteritidis con microesferas cargadas redujo significativamente la incidencia de Salmonella enteritidis recuperada de heces y órganos internos después del desafío oral. Como las vacunas de Salmonella enteritidis muertas convencionales. Sin embargo, las microesferas cargadas de Salmonella enteritidis también fallaron para proveer eliminación completa del patógeno de órganos internos y heces. Este fracaso puede ser atribuido al inherente retiro de antígeno de Salmonella enteritidis muerta.

Una simple dosis de microesferas cargadas con Salmonella enteritidis muerta administrada oral o intramuscularmente a pollos sucesivamente provocó respuestas inmunes locales y sistémicas y confirió protección significativa contra el desafío con bacterias vivas por las rutas intramuscular y oral (40).

Las bacterinas se administran por vía parenteral, generalmente en dos dosis con espacios de dos semanas (1), un aspecto negativo del uso de vacuna muerta es la necesidad de administrarla manualmente a las aves. Este método tiene labor intensa y la edad de las aves les da susceptibilidad de rompimiento de hueso durante el manejo, pero recientemente vacunas vivas atenuadas están disponibles y parecen ser eficaces en la protección contra un número de serovariedades de Salmonella aviar incluyendo Salmonella enteritidis (33), se informa de la administración subcutánea de bacterinas con adyuvante en emulsión de aceite para gallinas ponedoras, reduce de manera significativa la incidencia de diseminación fecal y la cantidad de S. enteritidis eliminadas en las heces, la frecuencia de aislamiento de Salmonella enteritidis en varios tejidos internos y la incidencia de producción de huevos con contenido contaminado (1).

Megan Vac1, es la primer vacuna viva de *Salmonella* permitida en Estados Unidos para su uso en aves, es una *Salmonella typhimurium* mutante que ha sido atenuada por supresión de los genes necesarios para sintetizar monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), y para producir el receptor en la superficie de la célula para la absorción de este importante metabolito, aunque las mutaciones disminuyen severamente la habilidad del organismo para infectar y persistir dentro del huésped, la infección fue suficiente para obtener inmunidad fuerte, larga y duradera humoral y celular. El uso del organismo vivo atenuado *Salmonella typhimurium* para estimular inmunidad contra *Salmonella* antes de la restricción de alimento puede ser un método importante para reducir los problemas por *Salmonella enteritidis* en gallinas en pelecha forzada (33).

Tanto las vacunas muertas como vivas se han relacionado con protección significativa contra las salmonelas, aunque ningún tipo de vacuna ha demostrado proporcionar de manera consistente una barrera impenetrable contra la infección. Incluso, la privación de agua y alimento y el estrés ambiental, como el calor, pueden comprometer la efectividad de la vacuna. Por lo tanto, igual que la exclusión competitiva, la vacunación se utiliza de manera efectiva en conjunto con las prácticas de manejo que reducen las oportunidades para las parvadas de ser expuestas contra las salmonelas (10). De ahí que, se puede deducir que con la inmunización por vacunas y algunas bacterinas es posible la prevención de la enfermedad (en especial en su forma severa), pero no de la infección y la potación de salmonelas (1).

La administración de la vacuna de cepa de *Salmonella* viva antes o simultáneamente con el cultivo de exclusión competitiva (CE por sus siglas en inglés) revelo el mejor efecto protector porque tal combinación garantiza una adecuada persistencia de la cepa vacunal como prerrequisito para la expresión de los efectos de exclusión por vacunas de *Salmonella* vivas en pollos muy jóvenes y el desarrollo de una respuesta inmune fuerte permitiendo protección en aves adultas.

El efecto protector mejorado producido por un uso combinado de la vacuna viva de Salmonella y el cultivo de exclusión competitiva por encima de aquel después del uso de una sola de estas medidas puede ser atribuido al hecho que el cultivo de exclusión competitiva administrado a los pollos después de la incubación resulta en el desarrollo de una microflora intestinal más eficiente y, por lo tanto, en una prevención sólida de multiplicación cecal de la cepa de Salmonella de desafío detectable de forma regular en aves adultas (43).

No se espera que la vacunación confiera completa protección contra la infección en el campo. Un efecto máximo de vacunación puede ser esperado si la infección es conservada por buena higiene (19).

La norma oficial mexicana NOM-047-ZOO-1995, es la que regula los requisitos mínimos para las vacunas, bacterinas y antígenos empleados en la prevención y control de la salmonelosis aviar (44).

11.2 Uso de exclusión competitiva

El desarrollo de resistencia a las salmonelas en aves jóvenes, se ha atribuido a la adquisición de microflora protectora que compite con las salmonelas por sitios receptores en el intestino, o produce factores antagónicos que inhiben el crecimiento de las salmonelas (10).

Estudios de investigación en Finlandia a principios de la década de los 70's sugirieron que la susceptibilidad de los pollitos recién nacidos a la colonización por salmonelas fue debida al establecimiento tardío de la microflora intestinal normal en los pollitos criados de acuerdo a los métodos modernos y masivos de producción. También demostraron que las infecciones por Salmonella pueden ser prevenidas por alimentación con cultivos desarrollados anaerobicamente obtenidos de la flora intestinal de aves adultas a los pollitos recién nacidos. Esta técnica es conocida como "exclusión competitiva" (1,16).

La introducción de contenido de intestino o cultivos de contenido de intestino de aves adultas puede proteger a las aves jóvenes contra la infección por Salmonella (50), su uso ha prevenido efectivamente la colonización de Salmonella en pollos, especialmente cuando microorganismos cecales indefinidos de adultos son administrados a pollos pequeños (9,10,29), por ejemplo las preparaciones de células de bazo crudo de huéspedes inmunes transfieren a los receptores sanos incremento en su resistencia a Salmonella (42).

Los cultivos de exclusión competitiva dan a los pollos el día que nacen velocidad de maduración de su microflora intestinal y en pocas horas incrementan significativamente la resistencia de los pollos a las salmonelas (16).

La administración de un cultivo de exclusión competitiva ha resultado en el desarrollo de una microflora compleja más fuerte que la normal, que hace a los pollos más resistentes a infecciones (9), se ha demostrado que la cuenta de Salmonella typhimurium decrece significativamente en codornices japonesas desafiadas artificialmente que han sido tratadas al día de edad con contenidos cecales de pollo.

Cultivos liofilizados mezclados en el alimento han sido evaluados y son actualmente usados extensivamente para "probióticos" comerciales vendidos para aves y otros animales domésticos (30). Broilact es el primer producto de exclusión competitiva (CE) y fue desarrollado por Orion Corporation Orion Pharma Animal Health en Finlandia. Ha sido utilizado para reducir la colonización del intestino por Escherichia coli, Clostridium perfringens, y Campilobacter jejuni, y muchos estudios han demostrado este efecto en varias salmonelas; por ejemplo: Salmonella enteritidis y Salmonella infantis.

Se ha demostrado que el tratamiento con Broilact reduce la viscosidad del ileon, incrementa el contenido de materia seca en las heces, y mejora el nivel de crecimiento de los pollos de engorde (50).

Varios métodos de administración de microorganismos de cultivos cecales para la reducción de colonización de Salmonella en las aves han sido evaluados. La eficacia de cultivos cecales depende de los sistemas de tratamiento que aseguran el rápido establecimiento de flora protectora en los ecosistemas intestinales de los pollos recién incubados

La aspersión de cultivos en los huevos o pollitos en la incubadora fue evaluada en un intento para proveer exposición temprana a cultivos protectores. La inyección *in ovo* ha sido sugerida también como un método de entrega temprana de organismos benéficos a los embriones de pollo (10, 16,30).

La presencia y persistencia de salmonelas en las incubadoras comerciales limita la efectividad de la exclusión competitiva aplicada después de la distribución de los pollos en las casetas de crecimiento, porque la colonización de los pollitos puede ocurrir antes del tratamiento con E.C (16).

El uso de la exclusión competitiva en la avicultura como medida preventiva para las infecciones por Salmonella puede verse limitado por la ocurrencia frecuente de coccidiosis subclínicas en el campo (7).

La administración de cultivos de E.C puede contribuir de manera significativa en un esfuerzo por controlar Salmonella, pero todavía son necesarios la limpieza y desinfección apropiadas, bioseguridad, reducción de roedores, y otras medidas similares para minimizar la oportunidad de la exposición a las salmonelas. Los factores que pueden alterar la microflora intestinal normal, tales como la administración de antibióticos y la privación de agua y alimento, también pueden interferir con las capacidades protectoras de los cultivos (10).

Algunas pruebas indicaron que los cultivos de bacterias cecales encapsuladas y liofilizadas en cuentas de alginata fueron rápidamente consumidas por los pollos recién nacidos y redujeron efectivamente la colonización por Salmonella.

Los cultivos de exclusión competitiva, encapsulados en cuentas de alginata y proveídos como un aditivo superior en el alimento, comprobaron ser un simple y

efectivo método de entrega que puede ser fácilmente incorporado dentro de las practicas actuales de la industria (30).

Si la cepa vacunal es administrada antes del cultivo de exclusión competitiva, puede convertirse en un componente integrado de la flora intestinal en desarrollo. Esto es apoyado por la observación que la exposición de pollos a salmonelas de tipo salvaje antes del tratamiento, lo cual es particularmente importante en incubadoras, puede reducir sustancialmente el efecto protector de C.E.

La eficacia reducida de los cultivos de C.E en caso de un procedimiento de administración de salmonelas probablemente puede ofrecer la oportunidad para combinar efectivamente vacunas vivas de *Salmonella* y cultivos de C.E (43).

11.3 Modelos de infección

La evaluación de métodos futuros para controlar la infección por *Salmonella enteritidis* en gallinas ponedoras (como vacunación) o la multiplicación del patógeno dentro de los huevos (como la refrigeración) requiere modelos de infección experimental que conduzcan perfectamente a la contaminación del huevo (16), esta producción de huevos contaminados es decisiva para la utilidad de los modelos de infección experimental para evaluar y desarrollar estrategias de control de *Salmonella enteritidis* (9,25), la habilidad para inducir la contaminación de huevo por gallinas infectadas tiene a veces varianza significativa entre cepas de *Salmonella enteritidis* (22,25).

Un modelo de infección describe como la infección desarrolla y persiste en los animales bajo parámetros experimentales específicos dados, tales como la edad y raza del animal, instalaciones y condiciones de la caseta, organismo de elección de desafío, y niveles de dosis de la infección (9).

La infección por Salmonella enteritidis es normalmente a través de la ruta oral y es clínicamente asintomático. La colonización intestinal y la invasión de órganos internos por el patógeno son indicaciones de la infección por Salmonella enteritidis. Sin embargo, experimentalmente, la infección clínica puede ser alcanzada cuando los pollos son desafiados parenteralmente (40).

La dosis necesaria para una infección es, serotipo, fagotipo, y cepa dependiente, desde estos parámetros influye la invasibilidad y la mortalidad (9), además el potencial de los modelos de infección experimental para generar huevos contaminados internamente puede depender del grado que ellos llevan de colonización del ovario y del oviducto (10,25).

Gast y cols. (2003), demostraron que un pasaje repetido a través de tejidos reproductivos de pollo incrementó la habilidad de una cepa de Salmonella enteritidis para inducir contaminación interna de los huevos en un modelo de infección oral (25) y aunque la inoculación oral es considerada para simular más las infecciones que ocurren naturalmente, generalmente conduce a bajas frecuencias de contaminación general de huevo. Otras rutas alternativas de administración como la inoculación intravenosa y por aerosol con Salmonella pueden también resultar en infección sistémica y contaminación de huevo, la infección sistémica de gallinas con Salmonella enteritidis también ha sido iniciada por inoculación conjuntival o por introducción ascendente dentro del tracto reproductivo, en un estudio reciente, la inoculación intravenosa, intracloacal, y la inoculación oral condujeron a la recuperación de Salmonella enteritidis de yema y de albúmina, aunque la relación entre las frecuencias de aislamiento de yema y albúmina no fue la misma para todas las cepas de Salmonella enteritidis probadas (22), todas las rutas alternativas de exposición a Salmonella enteritidis, incluyendo la administración intravenosa y aerosol, también han llevado usualmente a producción de huevo contaminado bastante infrecuente (25), en la mayoría de estudios la contaminación de yema ocurre más a menudo que la contaminación de albúmina por los tres métodos de administración de Salmonella enteritidis.

La inoculación intravenosa resultó en mayor frecuencia de aislamiento de Salmonella enteritidis del ovario y oviducto que la producida por inoculación oral sin alguna evidencia de diferencia correspondiente en la frecuencia de aislamiento de los huevos (22).

Seleccionando (o induciendo) la habilidad de las cepas de Salmonella enteritidis para colonizar los tejidos reproductivos de las aves se puede mejorar la frecuencia de contaminación de huevo obtenida por infección experimental (25).

La asociación de la administración intravenosa de Salmonella enteritidis con los números significativamente superiores de contaminantes de yemas de huevo que fueron observados después de la administración oral en un estudio sugieren que los modelos de infección experimental que incluyen la inoculación intravenosa pueden ser de limitada importancia para simular los niveles de contaminación por Salmonella enteritidis presentes en huevos de gallinas naturalmente infectadas (22).

El pasaje y almacenamiento en el laboratorio de los aislados de Salmonella enteritidis puede atenuar su habilidad para causar la contaminación de huevo (25).

11.4 Desinfectantes

Una gran variedad de desinfectantes químicos se utilizan y recomiendan por su eficacia contra las salmonelas. Se comunica que la aplicación de peróxido de hidrogeno, ácido acético, ácido láctico, sorbato de potasio, cloro, o fosfato trisódico reduce la incidencia o cantidad de Salmonella contaminante.

La irradiación ha recibido considerable atención como un método potencial para eliminar a las salmonelas de los alimentos y piensos, debido a que casi todas las cepas de salmonelas parecen ser muy susceptibles a los efectos letales de la irradiación.

La radiación gamma ha tenido éxito en reducir la contaminación con *Salmonella* en la carne de aves, productos de huevo y alimentos avícolas.

La fumigación con formaldehído o peróxido de hidrógeno, o la aspersión con hidrocloreto de polihexametileno biguardina, ha demostrado ser eficaz para el control de salmonelas en huevos incubados.

Las fumigaciones con ozono y formaldehídos son eficaces como desinfectantes en las incubadoras (10).

12.- Persistencia:

La persistencia ambiental de las salmonelas paratifoideas, es un factor importante en la epidemiología de estos microorganismos en las aves, por originar oportunidades para la transmisión horizontal de la infección dentro y entre parvadas (10), pero solo una limitada cantidad de información ha sido reportada concerniente a los factores involucrados en la persistencia de *Salmonella* en pollos (60).

12.1.- Vectores de la infección en las casetas avícolas

En un complejo avícola integrado existen numerosos factores potenciales para la contaminación por *Salmonella*. Estos factores incluyen: pollitos, alimento, roedores, aves, insectos, transporte y procesamiento. Por lo tanto la exposición a *Salmonella* puede ocurrir en cualquier momento durante el crecimiento o en el procesamiento (7)

Los reservorios del entorno, incluyendo el polvo de la nave avícola y roedores, se ha demostrado que son causa importante de la introducción y perpetuación de la

infección por Salmonella enteritidis en lotes de ponedoras (27), en suma a los largos periodos de sobrevivencia ambiental de Salmonella enteritidis, estudios recientes han indicado que los ratones infectados son una fuente potencial de infección para parvadas subsecuentemente infectadas (17), Henzler *et al* encontraron que los ambientes positivos a Salmonella enteritidis tienen correlación con ratones positivos a Salmonella enteritidis y que el fagotipo de los aislados de ratones fue el mismo que el fagotipo de los aislados de ratones fue el mismo que el fagotipo encontrado en el ambiente (17).

La rata negra (Ratus ratus) es un hábil trepador, y es muy cauta con invasores externos; además, algunas ratas negras son resistentes a los rodenticidas. Si las ratas negras infectadas con Salmonella enteritidis ocupan los galpones cerrados, puede ser muy difícil de erradicar la Salmonella enteritidis de esos galpones (41).

La infestación de instalaciones avícolas por coleópteros nocivos es un fenómeno común. En Dinamarca aproximadamente 50% de las instalaciones de ave pesada comercial están reportadas como infestadas, recientes investigaciones han demostrado que el Alphitobius diaperinus puede albergar bacterias y por lo tanto tiene el potencial para actuar como reservorio para la bacteria, además los escarabajos pueden sobrevivir en sitios que son inalcanzables a los procedimientos de sanitización y desinfección (54),

En un estudio de Lidsey y cols. las parvadas donde insectos nocivos, aves salvajes, y roedores tuvieron acceso al alimento antes de ser suministrado fueron 6.2 veces más probables de ser positivas a la infección por Salmonella enteritidis, y en el mismo estudio la prevalencia de Salmonella enteritidis en ratones de casetas ambientalmente positivas fue casi cuatro veces mayor que en ratones de casetas ambientalmente negativas, este resultado apoya la teoría que el ratón puede amplificar y diseminar la Salmonella enteritidis en las casetas de postura (20).

12.2.- Resistencia a desinfectantes

La aplicación de desinfectantes químicos para las casetas es de dudosa efectividad. Los fenoles y los compuestos cuaternarios de amonio se utilizan con frecuencia para este propósito, pero la limpieza y la desinfección de las casetas contaminadas no siempre han tenido éxito en la eliminación de salmonelas, se ha encontrado que la fumigación con formaldehído es muy eficaz para este objetivo, pero consideraciones generales de seguridad han limitado su disponibilidad y utilización (10)

La limpieza y desinfección, en combinación con fumigaciones con formaldehído, el uso de bacterinas de *Salmonella enteritidis*, o administración de productos de exclusión competitiva, no han disminuido la incidencia de fuentes de *Salmonella enteritidis* en las casetas, y esta falta de habilidad para reducir la *Salmonella enteritidis* de estas casetas puede estar relacionada a recontaminación de la caseta por roedores infectados u otras fuentes de reintroducción y no a la resistencia de la *Salmonella* a los desinfectantes (9,17).

Algunos galpones pueden ser limpiados y desinfectados y permanecer negativos para *Salmonella enteritidis* mientras otros permanecen positivos después de múltiples tratamientos de limpieza y desinfección. Esto sugiere la posibilidad que los organismos de *Salmonella enteritidis* difieren en su resistencia a desinfectantes. Paulsen y cols. Sugieren que la *Salmonella* tiene una base molecular para resistir a antisépticos y desinfectantes. Esos aislados con un gen particular muestran resistencia a los desinfectantes (17). Lindsey y cols. Mencionan que las casetas que fueron fumigadas entre parvadas tuvieron una menor prevalencia de *Salmonella enteritidis* que las casetas que no fueron ni fumigadas ni lavadas (20), pero el incremento de la eliminación de *Salmonella enteritidis* durante el periodo de pelea podría incrementar la carga de *Salmonella enteritidis* en el ambiente de la caseta y los problemas de postura en la eliminación de *Salmonella enteritidis* durante la

limpieza y desinfección de la instalación de postura antes de comenzar una nueva parvada de postura (31).

No se ha identificado la actividad del agua, como un factor importante para permitir la persistencia de las salmonelas en las casetas. Aunque a veces pueden persistir las salmonelas por largos periodos en la cama de aves, también se ha considerado de manera ocasional, que el uso de camas ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento o sobrevivencia de *Salmonella*. Turnbull y Snoefenbos, sugirieron que este efecto podría resultar por un aumento de pH debido a la disolución de amoníaco (10).

12.3.- Resistencia a los antibióticos

En muchos países se ha observado una alta proporción de cepas de *Salmonella* con resistencia múltiple a los antibióticos. En los países industrializados, la principal causa de ese hecho fue el excesivo uso de antibióticos en las raciones de los animales, como el factor de crecimiento, y también en el tratamiento indiscriminado de personas y animales por prescripción médica y veterinaria (1).

La resistencia a múltiples fármacos transmitida genéticamente por plásmidos entre las bacterias entericas es un problema en las infecciones por *Salmonella* (37).

13.-Referencias bibliográficas:

- 1.- Acha Pedro N., y Cifres Oris. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales tercera edición. Vol. I Bacteriosis y micosis. Organización panamericana de la salud. Washington D.C: 2001. Pp.240 – 252
- 2.- Aiello E. Susan. El manual Merck de veterinaria quinta edición. Grupo océano S.A. Barcelona España. 2000. Pp 132
- 3.- Alfaro Camacho Julio César, García Espinosa Gary, et al. Inmunoprofilaxis contra la infección por Salmonella enteritidis en pollos de engorda mediante el uso de linfocinas. Veterinaria México 31: 27 -31, 2000
- 4.- Alonso Elena, Vázquez Rebeca y Cano Nuria. Etiquetado y marcado del huevo: garantía de origen y trazabilidad.
<http://www.huevo.org/dossier.doc> visita: 27/03/2005
5. - Arakawa. A, et al. Influence of Coccidiosis on salmonella colonization in broiler chickens under floor pen conditions. Poultry Science71: 59-63, 1992.
- 6.- Avellaneda Gloria E. Vacunas vivas contra Salmonella. Avicultura profesional 10: 126-129,1993
- 7.- Bailey Stan J., Salmonella en avicultura y en productos avícolas. Avicultura profesional Vol. 11 # 4, 1994
- 8.- Bates Carol y Granshaw Duncan. Control de la Salmonella: Un ejemplo de trabajo. Avicultura profesional 12: 164- 174, 1995

- 9.- Bjerrum L., Engberg R.Mand *et al.* infection models for *Salmonella typhimurium* DT110 in day – old and 14 – day- old broiler chickens kept in isolates. *Avian Diseases* vol. 47 N° 4. 2003 Pp 1474 –1482
- 10.- Calnek B. W: *et al.* Enfermedades de las aves segunda edición en Español, traducida de la decimocuarta edición en Inglés de “Diseases of poultry” 1997. Editorial Manual Moderno. México DF. , 2000
11. - Cason J. A, Bailey J. S y Gox N. A. Location of salmonella typhimurium during incubation an hatching of inoculated eggs. *Poultry Science* Vol. 72: 2067- 2073, 1993
- 12.-Castellan David M., Kinde Hailu *et al.* descriptive study of California egg layer premises and analysis of risk factors for *Salmonella enterica* serotype enteritidis as characterized by manure drag swabs. *Avian Diseases* 48: 550-561, 2004
- 13.-Castello Llobet José A. Pontes Pontes Miguel, y Franco González Fernando. Producción de huevos. Real escuela de avicultura primera edición, Barcelona España, 1989. Pp. 11,240-253
- 14.- Centro nacional de Salmonella de Uruguay. *Salmonella*.
<http://www.ops.org.uy/pdf/salmonella.pdf>. visita 27/03/2005
- 15.- Chávez De la peña Eugenia, Higuera Iglesias Anjarath. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud pública de México* 43: 211-216, 2001.
- 16.- Cox N. A., Bailey >J.S, *et al.* *In ovo* administration of competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. *Poultry science* 71: 1781-1784, 1992.

- 17.- Davison Sherill *et al.* The role on disinfectant resistance of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in recurring infections in Pennsylvania eggs quality assurance program monitored flocks. *Avian Diseases* 47: 143 – 148, 2003
- 18.- Eyigor Aysegul y Taytun K, carli. Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real – time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Diseases* vol 47 N° 2 Pp380
- 19.- Feberwee A., Uries T.S., Hartman E.G., *et al.* Vaccination against *Salmonella enteritidis* in Dutch commercial layer flocks with vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic *Salmonella* test. *Avian Diseases* 45: 83-91,2001
- 20.- Garber Lindsey *et al.* *Salmonella enterica* serotype enteritidis in table eggs layer house environments in mice in U.S. layer houses and associated risk factors. *Avian Diseases* 47: 134-142, 2003
- 21.- García Salas Juan Antonio, Contreras *et al.* Revisión de zoonosis ornitológicas. *Ciencia UANL/* vol VI, N° 1 enero – marzo 2003
<http://www.uanl.mx/publicaciones/ciencia-uanl/vol6/1/pdf/ejes.pdf> visita 23/02/2004
- 22.- Gast Richard K., Guard-Petter Jean, *et al.* Characteristics of *Salmonella enteritidis* contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Diseases* 46: 629-635, 2002
- 23.- Gast Richard K., Bailey W. Mitchell, *et al.* Detection of airborne *Salmonella enteritidis* in the environment of experimentally infected laying hens by an electrostatic sampling device. *Avian Diseases* 48: 148-154, 2004

- 24.- Gast Richard K. Detection of salmonella enteritidis in experimentally infected laying hens by culturing pools of egg contents. Poultry Science 72: 267-275, 1993
- 25.- Gast Richard K, Guard Petter Jean, *et al.* Effect of prior serial in vivo passage on the frequency of salmonella contamination in eggs from experimentally infected laying hens. Avian Diseases 47: 633-639, 2003.
- 26.- Gast R. K. Evaluation of plating for detecting Salmonella enteritidis in pools of egg contents. Poultry science 72: 1611-1614, 1993.
- 27.- Gast R. K., y Holt s. Peter. Persistence of Salmonella enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. Poultry science 77: 1759-1786, 1998
- 28.- Gast R.K., Nasir M.S., *et al.* Serologic detection of experimental salmonella enteritidis infections in laying hens by fluorescence polarization and enzyme immunoassay. Avian Diseases 46: 137-142, 2002
- 29.- Gordon R.F, Jordan W. FT. Enfermedades de las aves 2° edición 1985. Traducido de Poultry Diseases 1982. Ed Manual Moderno. Pp 19-28.
- 30.- Hollister A. G., Corrier D.E., *et al.* Effect of cecal cultures encapsulated in alginate beads or lyophilized in skim milk and dietary lactose on salmonella colonization in broiler chicks. Poultry science 73: 99-105, 1994.
- 31.- Holt Peter S., y Porter Robert E. effect of induced molting on the course of infection and transmission of salmonella enteritidis in white leghorn hens of different ages. Poultry science 71: 1842-1848, 1992.

32.- Holt S. Peter y Porter E. Robert.Jr. effect of induced molting on the recurrence of a previous Salmonella enteritidis infection. Poultry Science 72:2077-2083, 1993

33.- Holt S. Peter, Gast K. Richard *et al.* Use of a live attenuated Salmonella typhimurium vaccine to protect hens against Salmonella enteritidis infection while undergoing molt. Avian Diseases 47: 656-661, 2003

34.- Hong Yang, Liu Tongrui, *et al.* A restriction fragment length polymorphism – based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identifying salmonella serotypes. Avian diseases 47: 387-395, 2003.

35.- Hudson Charlene R., Garcia Maricarmen, *et al.* Determination of close genetic relatedness of the major Salmonella enteritidis phage types by pulsed – field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several Salmonella virulence genes. Avian Diseases 45: 875- 886, 2001.

36.- Huevo para plato.

<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAhuevo.htm> visita 27/03/2005.

37.- Jawetz, Melnick y Adelberg, *et al.* Microbiología médica 17° edición en español traducida de la 22° edición en Inglés. Editorial Manual Moderno S.A de C.V Méx Df 2002. Cap 16 Pp 272-282

38.- Kinde Hailu, Castellan David M., *et al.* the occurrence and distribution of salmonella enteritidis and other serovars on California egg laying premises; a comparison of two sampling methods and two culturing techniques. Avian Diseases 48: 590-594, 2004

39.- Leiva Castillo Virginia, Valdés Arney Eliana, Cisneros Despaigne Eugenio, *et al.* Determinación de Salmonella y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina.

<http://www.bsu.sld.cu/revistas/ali/vol10-2-96/alio3296.htm> visita 27/03/2005

40.- Liu Wei, Yang Yiyang, Cheng Neal, y Kwang Jimmy. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against Salmonella enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. Avian Diseases 25:797-806, 2001

41.- Matsumoto A., Miyama M., y Murakami S. comparison of Salmonella isolation rates in different types of egg-layer hen houses in Chiba, Japan. Avian Diseases 45: 195-200, 2001

42. - Mc Gruder E.D. Ray P. M, et al. Salmonella enteritidis immune leukocyte – stimulated soluble factors : effects on increased resistance to salmonella organ invasion in day old Leghorn chicks. Poultry science 72: 2264- 2271,1993

43. - Methner Ulrich, Bendt Angela, y Sternbach Günther. Combination of competitive exclusion and immunization with an attenuated live Salmonella vaccine strain in chickens. Avian Diseases 45: 631-638, 2001

44.- Norma oficial mexicana NOM – 047 – ZOO – 1995, Requisitos mínimos para las vacunas y antígenos empleados en la prevención y control de la salmonelosis aviar.

45.-Okamura Masashi, Miyamoto Tadashi, Kamijima Yuca, et al. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between Salmonella enteritidis and other Salmonella serovars. Avian Diseases 45: 962-971, 2001

46. - Pereira N., González Delfino A., et al. Estudio físico-climático de la producción de huevos comerciales en Venezuela.

<http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/zt0312/texto/fisicoclimatico.htm>

Visita 27/03/2005

- 47.- Porta Ramón. Problemática actual de la Salmonella enteritidis.
<http://www.eumedia.es/articulos/mg/112Salmonella.html> visita 27/03/2005
- 48.- Producción de huevo de Gallina en México 1996-2002.
<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prohue9601.htm> visita 27/03/2005
- 49.- Richardson L.T., Hofacre C.L, Mitchell B. W, and wilson J.L. effect of electrostatic space charge on reduction of airborne transmission of salmonella and their progeny. Avian Diseases 47: 11352- 1361, 2003
- 50.- Schneitz C., y Renney D.J effect of a commercial competitive exclusion product on the colonization of Salmonella infantis in day – old pheasant chicks. Avian diseases 47: 1448-1451, 2003
- 51.- Schutze goron E., Fawcett Holli A., Lewno Mary J., Flick Ellie I., et al. Prevalence of Salmonella enteritidis in poultry shell eggs in arkansas.<http://www.sma.org/smj/96sept8.htm>. visita 23/feb/2004
- 52.- Seguridad de la producción de huevos y derivados.
<http://www.portalalimentario.com/PDF/SEGURIDAD%20DE%20LA%20%PRODUCCION%DE20HUEVOS%y%20DERIVADOS.pdf> visita 27/03/2005
- 53.- Seo Kun-Ho, Holt Meter S., et al. mucosal humoral immunity to experimental Salmonella enteritidis infection in the chicken crop. Avian Diseases 46: 1015-1020, 2002
- 54.- Skov M.N, spencer A.G, et al. The role of litter beetles as campylobacter spp. Between broilers flocks. Avian Diseases 48: 9-18, 2004.

55.- Skov M.N., Feld N.C., et al. The serologic response to *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in experimentally infected chickens, followed by an indirect lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay and bacteriologic examinations through a one year period. *Avian Diseases* 46: 265-273;2002.

56.- Solano C., Sesma B., Álvarez M., Dorronsorro I., et al. Diferenciación de cepas virulentas de *Salmonella enteritidis*; aplicación al diagnóstico clínico y al control sanitario.

<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple3/suple12html>
visita 27/03/2005

57. - Tellez G., Dean C.E., Corrier D.E., et al. Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids, and *Salmonella enteritidis* organ invasion in Leghorn chicks. *Poultry Science* 72:636-642, 1993

58.- Thiagarajan D., Saeed A. M., y Asem E.K. mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. *Poultry science* 73: 89-98, 1994

59.- Uribe Ramos David G., Alvarado García Rafael, et al. Absceso pulmonar como manifestación de infección por *Salmonella* no Typhi. Presentación de un caso clínico. *Acta pediátrica de México* 35: 285-287, 2002.

60.- Virlogeux – Payand I., Mompant, et al. Low persistence of a large – plasmid – cured variant of *Salmonella enteritidis* in ceca of chicks. *Avian diseases* 47: 163-168, 2003

61.- Ward M.P, Ramer J.C, Proudfoot, Garnier, et al. Outbreak of salmonellosis in a zoologic collection of lorikeets and lorries (*Trichoglossus*, *lorius*, and *Eos* spp.) *Avian Diseases* 47: 493-498, 2003

62. - Walker Stuart t. Microbiología. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México DF 1999. Traducido de "Microbiology " 1998 U.S.A Pp.168-171.

63.-Yap Lee Fah, Low Sharon, Liu Wei, et al. detection and screening of Salmonella enteritidis-infected chickens with recombinant flagellin. Avian Diseases 45: 875-886, 2001.