

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Estudio epidemiológico de la frecuencia de
aislamiento de salmonella en pollos de
importación de la isla de Tenerife»**

Autor: Tulia M. Hernández Muñoz
Director: Dr. Antonio Sierra López y Dra. Ángeles Arias Rodríguez

Departamento de Pediatría, Obstetricia-Ginecología, Medicina Preventiva y Salud Pública

D. ANTONIO SIERRA LÓPEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA Y DÑA. ANGELES ARIAS RODRÍGUEZ, PROFESORA TITULAR DE MEDICINA PREVENTIVA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CERTIFICAN: Que Dña. Tulia M. Hernández Muñoz, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de investigación titulado *Estudio epidemiológico de la frecuencia de aislamiento de Salmonella en pollos de importación en la Isla de Tenerife*, el cual reúne las condiciones para ser presentado como **TESIS DOCTORAL**.

Y para que así conste, firmamos la presente en La Laguna a dieciocho de Mayo de mil novecientos noventa y nueve.

Fdo: Antonio Sierra López

Fdo: Angeles Arias Rodríguez

*A mis padres Javier y Tulia
A mi hermano Carlos*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que en alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo.

A los directores, Don Antonio Sierra López y Doña Angeles Arias Rodríguez, no sólo por su dirección y orientación en la realización de esta Tesis, sino también por el tiempo dedicado, así como por su constante estímulo y apoyo, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Venezuela por la concesión de la Beca que me ha permitido la realización de esta Tesis Doctoral en La Universidad de La Laguna.

A Dña. Cristobalina Rodríguez Álvarez, Profesora Titular de Medicina Preventiva y Salud Pública, por su incondicional y desinteresada colaboración.

A mis compañeros del Servicio de Microbiología y Parasitología y de Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias.

A mis compañeros del Área de Medicina Preventiva y Salud Pública.

Por último, expresar mi más profundo agradecimiento a mi madre, por su comprensión y aliento y a mi padre, por su orientación y apoyo incondicional en todo momento.

A todos mi reconocimiento.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo 1 Revisión y antecedentes

I.1. HISTORIA.....	1
I.2. TAXONOMÍA.....	9
I.2.1. Clasificación de kauffman.....	12
I.2.2. Clasificación de edwards y ewing.....	13
I.2.3. Clasificación de kauffman-white.....	14
I.2.4. Clasificación de le minor, veron y popoff.....	16
I.2.5. Clasificación ecológica.....	17
I.2.6. Otras clasificaciones.....	18
I.2.7. Evolución de la nomenclatura.....	19
I.3. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS GENERALES.....	23
I.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	25
I.5. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.....	26
I.6. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS ATÍPICAS.....	27
I.7. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.....	30
I.7.1. Antígeno somático “o”.....	30
I.7.2. Antígeno somático “m”.....	31
I.7.3. Antígenos flagelares “h”.....	32
I.7.4. Antígeno “vi”: capsular o de superficie.....	34
I.8. EPIDEMIOLOGÍA.....	35
I.8.1. Resumen histórico.....	35
I.8.2. Cadena epidemiológica.....	36
I.8.2.1. Reservorio y fuente de infección.....	36
I.8.2.2. Mecanismo de transmisión.....	38
I.8.2.3. Población susceptible.....	41
I.8.3. Infecciones por salmonelas no tíficas en españa.....	46
I.8.4. Alimentos implicados en brotes de salmonelosis en españa.....	53
I.8.5. Transmisión en la cadena de producción de pollos.....	55
I.8.6. Situación internacional de las salmonelas no tíficas.....	63

I.8.7. Red de vigilancia epidemiológica europea.....	70
I.8.8. El papel del comercio internacional de alimentos	72
I.9. DIAGNÓSTICO	75
I.9.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico	75
I.9.2. Diagnóstico microbiológico	81
I.9.2.1. Aislamiento de salmonella en muestras clínicas.....	81
I.9.2.2. Aislamiento de salmonella en alimentos	82
I.9.3. Métodos rápidos de detección de salmonella en alimentos	88
I.9.4. Métodos de tipificación: marcadores epidemiológicos.....	90
I.9.4.1. Métodos fenotípicos.....	92
I.9.4.2. Métodos genotípicos.....	97
I.9.5. Interpretación de los resultados del tipado molecular	105
I.9.6. Epidemiología molecular de la salmonella	108

Capítulo 2

Material y métodos

II.1. INTRODUCCIÓN.....	111
II.2. MUESTRAS ENSAYADAS	113
II.3. RECOGIDA DE MUESTRAS	115
II.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS	116
II.5. MÉTODO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	117
II.5.1. Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo.....	117
II.5.2. Enriquecimiento en medios líquidos selectivos.....	119
II.5.3. Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos.....	121
II.5.4. Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas	124
II.5.5. Técnica de aglutinación	127
II.5.6. Preparación del panel e identificación de salmonella.	128
II.5.6.1. Fundamentos de identificación de las pruebas bioquímicas	129
II.5.6.2. Fundamentos de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos ...	131
II.5.7. Tipificación salmonella spp.	133
II.5.8. Criterios microbiológicos de interpretación de los resultados.....	134
II.6. ENSAYO: MACRORRESTRICCIÓN EN CAMPO PULSADO	135
II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	142

Capítulo 3 Resultados

III.1. AISLAMIENTO DE SALMONELLA	143
III.1.1. Total de aislamiento de salmonella	143
III.1.2. Aislamiento de salmonella según origen	144
III.1.3. Total de aislamiento de salmonella según tipo de muestra	145
III.1.4. Total de aislamiento de salmonella según tipo de muestra y unidad analítica procesada	146
III.1.5. Total de aislamiento de salmonella según país y tipo de muestra	147
III.2. SEROTIPOS DE SALMONELLA AISLADOS	148
III.2.1. Total de serotipos de salmonella.....	148
III.2.2. Serotipos de salmonella aislados según origen y tipo de muestra	149
III.3. FAGOTIPOS DE SALMONELLA IDENTIFICADOS	150
III.3.1. fagotipos de s. Enteritidis, s. Typhimurim y. S. Virchow	150
III.4. TIPADO GENÓMICO	152
III.5. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE SALMONELLA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS	154
III.5.1. resultados globales	154
III.5.2. susceptibilidad de los aislados de salmonella frente a los antimicrobianos ensayados	155
III.5.2.1. Susceptibilidad de los aislados de salmonella enteritidis frente a los antimicrobianos ensayados	157
III.5.2.2. Susceptibilidad de los aislados de salmonella heidelberg frente a los antimicrobianos ensayados	159
III.5.2.3. Susceptibilidad de los aislados de salmonella typhimurim frente a los antimicrobianos ensayados	161
III.5.2.4. Susceptibilidad de los aislados de salmonella virchow frente a los antimicrobianos ensayados	163
III.5.2.5. Susceptibilidad de los aislados de otros serotipos de salmonella aislados frente a los antimicrobianos ensayados	165

Capítulo 4 Discusión

IV1. AISLAMIENTO DE SALMONELLA	199
--------------------------------------	-----

<i>IV.1.1. Aislamiento global de salmonella</i>	199
<i>IV.1.2. Aislamiento de salmonella según país de origen</i>	201
<i>IV.1.3. Total de aislamiento de salmonella según tipo de muestra</i>	205
<i>IV.1.4. Total de aislamiento de salmonella según unidad analítica procesada y tipo de muestra</i>	208
<i>IV.1.5. Total de aislamiento de salmonella según país y tipo de muestra</i>	210
IV.2. SEROTIPOS DE SALMONELLA AISLADOS	212
<i>IV.2.1. Total de serotipos de salmonella aislados</i>	212
<i>IV.2.2. Serotipos de salmonella aislados según país de procedencia</i>	215
IV.3. FAGOTIPOS DE SALMONELLA IDENTIFICADOS	220
<i>IV.3.1. fagotipos de s. Enteritidis</i>	220
<i>IV.3.2. fagotipos de s. Typhimurium</i>	224
<i>IV.3.1. fagotipos de s. Virchow</i>	226
IV.4. TIPADO GENÓMICO	228
IV.5. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE SALMONELLA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS	229
<i>IV.5.1. susceptibilidad del total aislados de salmonella frente a los antimicrobianos ensayados</i>	233
<i>IV.5.2. susceptibilidad de los serotipos de salmonella aislados con mayor frecuencia frente a los antimicrobianos ensayados</i>	238
<i>IV.5.2.1. Susceptibilidad de los aislados de salmonella enteritidis frente a los antimicrobianos ensayados</i>	239
<i>IV.5.2.2. Susceptibilidad de los aislados de salmonella heidelberg frente a los antimicrobianos ensayados</i>	241
<i>IV.5.2.3. Susceptibilidad de los aislados de salmonella typhimurim frente a los antimicrobianos ensayados</i>	242
<i>IV.5.2.4. Susceptibilidad de los aislados de salmonella virchow frente a los antimicrobianos ensayados</i>	246

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Pese a los avances tecnológicos, las enfermedades transmitidas por alimentos siguen siendo un serio problema de salud pública a nivel mundial. En las últimas décadas se ha informado del aumento en el número de brotes y casos esporádicos de infecciones alimentarias por *Salmonella* no *typhi-paratyphi*, representando en España la causa del 50% de los brotes de origen alimentario.

La salmonelosis no respeta fronteras en terminos de enfermedad humana y de las enormes pérdidas económicas que acarrea, tanto para el sector sanitario como para la industria alimentaria. La distribución global de los alimentos y el constante movimiento de viajeros alrededor del mundo facilita la oportunidad para ampliar la diseminación de patógenos, permitiendo la introducción de nuevos serotipos de *Salmonella* dentro de los límites geográficos de los países importadores.

La ubicuidad de las salmonelas en el medio natural y en varios sectores de la industria agro-alimentaria subraya la importancia de estos patógenos en la cadena alimentaria y su papel como agentes causantes de enfermedad humana, reflejado en el incremento del registro de brotes alimentarios por *Salmonella*, cada vez mayor, frente a otras bacterias patógenas

La mayoría de los casos de salmonelosis son causados por la ingestión de alimento de origen animal contaminado. Entre los alimentos involucrados en el aumento de la incidencia *Salmonella*, tanto en brotes como en casos esporádicos, se encuentran la leche, los huevos y las carnes. De éstas, la carne de aves de corral es de particular interés, siendo el pollo y sus derivados los más importantes. En España se ha observado un incremento constante y significativo de la presencia de *Salmonella* en carne de pollo, como responsable de brotes en los últimos años.

El origen de la contaminación de la carne de pollo es variado. En las granjas de aves ponedoras y reproductoras puede darse la transmisión vertical de la *Salmonella* desde los ovarios y oviductos de las gallinas al huevo (que también puede contaminarse con material fecal), resultando los huevos contaminados en su exterior y en su interior, en cuyo caso se obtienen pollos infectados en sus órganos internos, que constituyen la fuente de infección para otras aves. Al mismo tiempo, a nivel de

todo tipo de granjas, puede ocurrir la transmisión horizontal de la *Salmonella*, debido al consumo de piensos contaminados y a la presencia de *Salmonella* en el medio de crianza del ave.

Por su parte, el transporte y sacrificio de las aves representa una situación de estrés para las mismas, produciéndose una bacteriemia que provoca un aumento del porcentaje de animales infectados. En consecuencia la contaminación del producto final será el reflejo de la carga microbiana inicial de las aves, adquirida durante el período crianza y de la adquirida durante el transporte, sacrificio y procesamiento. En la planta de procesado, puede darse la contaminación cruzada de *Salmonella*, a través de equipos y utensilios contaminados. El escaldado, la extracción de las plumas, la evisceración y la separación en menudillos son los puntos de mayor transferencia de microorganismos, siendo a menudo mayor el número de canales y porciones procesadas contaminadas que el número de animales vivos que llegaron infectados o contaminados a la planta para su sacrificio.

De los más de 2.000 serotipos conocidos de *Salmonella*, alrededor de 10 constituyen la mayoría de los aislados en humanos cada año. A pesar del aumento de *S. enteritidis*, *S. typhimurium* es todavía, por sí sola, la causa más frecuente de gastroenteritis, bacteriemia y portadores asintomáticos en el mundo. Otros serotipos comunes en humanos, son *S. newport* y *S. heidelberg*, variando su frecuencia relativa en el tiempo y según la zona geográfica. Los serotipos aislados con mayor frecuencia en humanos, suelen corresponderse con los aislados en animales en un determinado tiempo y espacio.

En España, los aislamientos de *Salmonella* en alimentos, desde 1983 hasta 1996, muestran un persistente predominio de aislamientos en carne de aves, seguido de los huevos, siendo los tres serotipo más frecuentes el Enteritidis, Typhimurium y Virchow, al igual que en muestras de origen humano (casos esporádicos y brotes familiares y comunitarios).

Para identificar diferencias más allá del serotipo del microorganismo, se han desarrollado técnicas de tipificación bacteriana, que han ido evolucionado en forma

progresiva. Existen métodos basados en las características fenotípicas (fenotípicos) y métodos basados en la diversidad genómica entre grupos de aislamientos (genotípicos), utilizándose ambos para la investigación de brotes y para la vigilancia epidemiológica. En la década de los noventa, sobre todo se ha avanzado en el estudio molecular de la *Salmonella*, mediante la utilización de diversos métodos genotípicos, como el análisis de plásmidos, el análisis con endonucleasa de restricción y la reacción en cadena de la polimerasa.

Actualmente, algunos de estos métodos son utilizados en forma rutinaria, mientras que otras siguen siendo del dominio de laboratorios de referencia, dado sus costos, complejidad, etc. Entre los métodos fenotípicos más utilizados se encuentran los patrones de susceptibilidad frente antimicrobianos y la determinación de los fagotipos, ambos de amplio uso como marcadores epidemiológicos. Particularmente, en el caso de investigación de brotes causados por *Salmonella*, la identificación de fagotipos es una técnica de tipificación fiable.

Los métodos genotípicos nos permiten clasificar cepas muy relacionadas, o diferenciar aislamientos epidemiológicamente divergentes, de éstos, el análisis de macrorrestricción mediante la electroforesis en campo pulsado (PFGE) es una de los más utilizados en el estudio molecular de la *Salmonella*.

Estas técnicas han sido aplicadas para la investigación de la transmisión de *Salmonella* desde una fuente común (confirmando la importancia de la diseminación de *Salmonella* de los animales al hombre), para la determinación de la extensión de un brote y para la evaluación de medidas preventivas.

También han sido aplicadas al estudio de la transmisión de las resistencias a antimicrobianos entre las salmonelas y al estudio de las consecuencias del uso de antibióticos en la alimentación animal, problemas de gran interés en la actualidad, debido a que el mal uso dado a los antibióticos durante los últimos 50 años, ha provocado una enorme presión en los microorganismos para la selección de resistencias y las salmonelas no son la excepción.

La práctica de administrar agentes antimicrobianos a humanos y a animales para tratar infecciones y, en estos últimos, administrarlos a concentraciones subterapéuticas en los piensos (permitido desde 1950) para promover su crecimiento y prevenir enfermedades, a menudo está asociada al desarrollo de microorganismos multiresistentes a antimicrobianos, pudiéndose transferir estas resistencias entre las diferentes bacterias y de los animales al hombre.

Por estas razones, las infecciones causadas por *Salmonella* resistente a antimicrobianos están aumentando y se han convertido en un problema con grandes implicaciones de interés para la salud pública, ya que al aumentar la frecuencia de resistencias a antimicrobianos, en especial a los de uso en humanos, se reducen las posibilidades terapéuticas para infecciones graves. De ahí la importancia de enfatizar sobre la necesidad de hacer uso prudente de los antimicrobianos, tanto en los humanos como en los animales.

Ante la situación de las infecciones por *Salmonella* en humanos nivel nacional e internacional, en la que la carne de pollo es uno de los alimentos implicados con mayor frecuencia y considerando tanto el papel que juega el mercado de exportación e importación de alimentos para la introducción de nuevos serotipos en un determinado espacio geográfico, como el incremento observado en la aparición de cepas de *Salmonella*, de origen humano, resistentes a diversos antimicrobianos planteamos la realización de este estudio, analizando muestras de pollo importado para el consumo humano en la isla de Tenerife, siendo nuestros **objetivos** los siguientes:

- Conocer la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp. en pollos de importación para el consumo humano en la isla de Tenerife
- Determinar la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp. según el país de procedencia de las muestras
- Determinar la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp. según el tipo de muestra estudiada (muslos, pechugas, enteros)

- Determinar la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de la piel y carne, y en los casos en que se aisla en ambos tejidos simultáneamente
- Identificar los serotipos más frecuentes de *Salmonella*, en el total de muestras y por países
- Identificar los fagotipos de *Salmonella* de los serotipos más frecuentes.
- Caracterizar por un método genómico de tipificación los aislados de *Salmonella*.
- Ensayar la susceptibilidad *in vitro* de los aislados de *Salmonella* a diversos antimicrobianos.

I. REVISIÓN Y ANTECEDENTES

I.1. HISTORIA

En 1813, **Petit y Serres** caracterizan la fiebre tifoidea antes de la era de la bacteriología, sobre la base de los signos clínicos y de las lesiones ulcerosas del intestino (Le Minor, 1982).

En París, un poco más tarde en 1829 **P. Ch. A. Louis** diferencia la fiebre tifoidea de otras fiebres como la del tifus con la que era confundida, basándose en la presencia de nódulos linfáticos intestinales y la patología esplénica. Además, describe el fenómeno de las manchas rosa, la perforación intestinal y las hemorragias (Louis, 1829). También este año **Bretonneau** demuestra la contagiosidad de la fiebre tifoidea (Avril et al., 1992).

Por su parte, en Inglaterra en el año 1850 **William Jenner** distingue la tifoidea basándose en la evidencia patológica del engrosamiento de las placas de Peyer y de los nódulos linfáticos mesentéricos, resaltando que ataques previos de fiebre tifoidea protegían de ataques subsecuentes, mientras que en el caso del tifus no sucedía lo mismo (Jenner, 1850).

Seis años después (1856), **Budd** describe la naturaleza infecciosa de la fiebre tifoidea de acuerdo a datos epidemiológicos, sugiriendo que la transmisión de la enfermedad ocurría a través del agua contaminada con desechos, y que la fuente del agente infeccioso eran las heces humanas (Freeman, 1983).

Posteriormente, en 1868 **Pettenkoffer** pone en evidencia el rol de la ingestión de agua en la diseminación (Le Minor, 1982). Al año siguiente, **Wilson** propone el termino fiebre entérica como alternativa al de fiebre tifoidea, señalando la localización anatómica de la infección (Wilson, 1881).

En 1880, **Eberth** estudiando el bazo y ganglios linfáticos de enfermos fallecidos de fiebre tifoidea, descubre un bacilo gram-negativo que cuatro años más tarde, **Gaffky**, logra aislar y cultivar denominándole *Bacillus typhosus* (Moustardier,

1976; Le Minor, 1977; Del Rio Mapelli et al., 1980; Freeman, 1983; Joklik et al., 1986).

Cinco años después en 1885, **Salmon y Smith** descubren el *Bacillus cholerae-suis* durante una epidemia de cólera porcino describiéndole, erróneamente, como agente etiológico de la citada enfermedad (Pedro-Pons et al., 1975; Moustardier, 1976; Gómez Lus, 1980; Freeman, 1983; Joklik et al., 1986). A **Daniel Elmer Salmon** (1850-1914), patólogo veterinario americano, debe su nombre este género (Smith, 1977).

En 1888, **Gärtner** aisla y cultiva *Bacillus enteritidis* del bazo de un paciente fallecido en el curso de una infección alimentaria de origen cárnico (Moustardier, 1976; Gómez Lus, 1980; Freeman, 1983), conociéndose este microorganismo con el nombre de Bacilo de Gärtner en la literatura antigua. Al año siguiente, **Klein** aisla *Bacillus gallinarum* durante un proceso epidémico de tifus aviar. (Moustardier, 1976). Mientras que en un brote tífico aparecido en ratones de laboratorio en 1892, **Loeffler** aisla *Bacillus typhimurium* (Gómez Lus, 1980; Difco, 1984).

En 1896 **Widal** demuestra que el suero de enfermos afectos de fiebre tifoidea aglutinaba los cultivos vivos de *Bacillus typhosus*, sentando las bases para el serodiagnóstico (Pedro-Pons et al., 1975; Ferron, 1989). Este mismo año, **Achard y Bensaude**, aislan de dos enfermos con fiebre tifoidea un bacilo semejante al descrito por Eberth, capaz de aglutinar con el suero del propio paciente pero no con el antitífico. Estos autores denominaron paratíficos a los gérmenes y paratifoidea a la enfermedad (Pedro-Pons et al., 1975; Del Rio Mapelli et al., 1980). Por su parte, **Pfeifer y Kalle** producían la primera vacuna contra la fiebre tifoidea con organismos muertos por calor. (Pfeifer y Kalle, 1896).

Tres años después en 1899, **Gwyn** aisla un bacilo semejante al descrito años atrás por Achard y Bensaude (Moustardier, 1976). Finalmente, es en 1900 cuando **Schottmuller** consigue diferenciar el bacilo paratifoideo de Achard y Bensaude, del bacilo de Gwyn, denominándoles respectivamente *Bacillus paratyphosus A* y *B* (Gómez Lus, 1980; Joklik et al., 1986).

Por esta misma fecha, **Rettger** aisla *Bacillus pullorum* de una epidemia de diarrea blanca en pollos (Moustardier, 1976) y **Lignieres** propone que se denominen *Salmonella* a estos microorganismos en honor a D.E. Salmon, bacteriólogo norteamericano (López-Brea, 1980).

En 1902, **Castellani** aplica el método de absorción de aglutininas al análisis antigénico de las salmonelas, en particular al estudio de los antígenos somáticos y flagelares (Le Minor, 1982). Un año después, **Smith y Reagh** describen los antígenos somáticos y flagelares, el primero asociado con la substancia celular y el segundo con los flagelos (Freeman, 1983).

Varios años más tarde, en 1917 **Felix y Weil** denominan a los antígenos somático y flagelar como antígenos *O* y *H*, respectivamente. **Hirschfield** identifica un bacilo con características semejantes a *Salmonella paratyphi B* que no era aglutinable con el antisuero correspondiente pero si con el suero del propio enfermo. Le denominó *Salmonella hirschfieldii* (Pedro-Pons, 1975).

A partir de 1920, con el desarrollo de las técnicas de análisis de antígenos, y su aplicación a estos organismos se comenzaron a describir (aún se siguen describiendo), numerosos tipos de *Salmonella* que pueden diferenciarse por técnicas de serología (Freeman, et al., 1983).

Andrews, en 1922, demuestra que los antígenos flagelares pueden existir en un mismo cultivo bajo sus dos diferentes formas (Le Minor, 1982).

A los tres años, en 1925 **White** sienta las bases de una clasificación basada en la identificación de los factores antigénicos, trabajo que posteriormente fue completado por **Kauffman** en 1930 (Avril et al., 1992). Dos años después **Burnett** realiza los primeros estudios sobre lisogenia en *Salmonella*.

Felix y Pitt describen el antígeno *Vi* en 1934, describiendo que su presencia puede enmascarar la capacidad de aglutinación del antígeno *O*. Con ello se trazan las bases del análisis antigénico (Le Minor, 1982; Gotz y Juchems, 1983; Ferron, 1989).

Posteriormente, en 1936, **Craigie y Yen** establecieron el sistema de fagotípia de *Salmonella*, utilizando el fago *Vi II* para lisar cepas de *Salmonella typhi* (Linberh y Le Minor, 1984).

Caldwell y Ryerson aislan *Salmonella arizonae* del tracto intestinal de reptiles en 1939 (Moustardier, 1976; Le Minor et al., 1982a; Le Minor et al., 1982b). En el mismo año, **Reilly** demuestra el rol del sistema neurovegetativo en la patogenia de la fiebre tifoidea (Avril et al., 1992).

A partir del *Streptomyces venezuelae* se obtiene el Cloramfenicol en 1943. Poco después, **Woodward y Shadel**, lo utilizan para combatir la fiebre tifoidea, pasando a ser desde entonces el tratamiento de elección para esta enfermedad durante muchos años (Pedro-Pons, 1975; (Hornick, 1982; Velasco et al., 1982).

En cuanto al desarrollo en los procedimientos para detectar *Salmonella* en alimentos se puede señalar que en el período comprendido entre 1920 y 1950 es cuando se producen los mayores avances. Hasta esa fecha los métodos utilizados para detectar *Salmonella* en alimentos seguían siendo los mismos que se usaban para muestras clínicas. Dos factores hacían aparente la necesidad de desarrollar nuevos métodos para el procesamiento de alimentos. En primer lugar, usualmente el nivel de *Salmonella* es mucho menor en alimentos contaminados que en muestras clínicas; y por tanto el método tendría que ser más sensible para poder recuperarla. En segundo lugar, a diferencia de la *Salmonella* procedente de muestras clínicas, los microorganismos que sobreviven en alimentos, sobre todo en los procesados, pueden estar estresados, debilitados o lesionados. Estas células dañadas deben ser resuscitadas o restablecidas a sus condiciones fisiológicas antes de que puedan crecer en el laboratorio.

Durante este período son introducidos dos medios de enriquecimiento selectivo, los caldos de selenito y tetratonato. Pasando éste último por una serie de modificaciones. También es introducido el agar sulfito bismuto. Todos siguen siendo usados hoy en día (Andrews, 1995).

En 1950, se describen las primeras resistencias al Cloramfenicol (OMS,1978). Este mismo año **Zinder y Lederberg** usando *S. typhimurium* descubren la transducción genética, transferencia de información genética de una célula a otra por una partícula viral, el bacteriófago P22. Como resultado de este trabajo inicial se desarrollo la sofisticada genética de la *S. typhimurium*, de la que se tiene un mapa cromosómico que es el segundo después de *E. coli* en detalle e información (Zinder y Lederberg, 1952).

Durante la década de los cincuenta se formula el caldo de Rappaport, el caldo de selenito sufre diversas modificaciones y muchos de los otros caldos de enriquecimiento selectivo y agares son modificados por adicción de suplementos como antibióticos, sulfas, surfactantes, factores de crecimiento, colorantes y sales inorgánicas (Andrews, 1995).

Además, por estas fechas se realizan los primeros estudios comparativos de diferentes caldos de enriquecimiento selectivo y agares para la recuperación de *Salmonella* a partir de muestras clínicas y de alimentos, incubándose los caldos a temperaturas superiores a la normal (35°-37°C) para reducir el sobrecrecimiento de competidores (Andrews, 1995).

En los años siguientes, década de los sesenta, se recomienda el uso del caldo lactosado, y son introducidos el agar Hektoen Entérico (HEA) y el agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD). En 1967, se realiza el clásico estudio colaborativo para validar los métodos de cultivo convencionales, 25 años después (1992) sus resultados fueron comparados con pruebas de diagnóstico rápido (Andrews, 1995).

Este período de los años sesenta es el inicio de la denominada “Edad de Oro” de los estudios comparativos, los cuales determinaban la efectividad de varios caldos de enriquecimiento y placas de agar. Estos estudios continuan su ascenso hasta los años setenta, preocupándose de los efectos de factores como la temperatura y el tiempo de incubación, el pre-enriquecimiento y el enriquecimiento selectivo, el medio aeróbico o anaeróbico, el tamaño de la muestra, el volumen de subcultivo del

medio de pre-enriquecimiento al medio de enriquecimiento selectivo, y el uso de surfactantes.

Además de estos estudios, generalmente, realizados en laboratorios individuales se comienza tanto en Estados Unidos como en Europa la realización de varios trabajos comparativos sobre aspectos referentes al método de cultivo.

En esta era de los estudios comparativos, era bastante frecuente que diferentes investigadores obtuvieran diversos resultados al comparar los mismos medios de enriquecimiento selectivo, agares selectivos o temperaturas de incubación. Los responsables de estas discrepancias serían al menos uno de los siguientes factores:

- La variabilidad inherente a diferentes tipos de alimentos
- Distintos niveles de contaminación por *Salmonella* o diferentes rangos de *Salmonella*/coliformes en los alimentos
- Uso de cultivos puros
- Uso de alimentos contaminados de forma natural o artificial
- Modificaciones del medio original, período o temperatura de incubación
- Diferencias en la preparación y almacenamiento del medio
- Diversas interpretaciones por los analistas de resultados de pruebas subjetivas.

Durante los años setenta se hacen intentos para desarrollar y validar métodos rápidos. Para hacer el método de cultivo más rápido, los períodos de 24 horas de incubación para pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo se redujeron a 6-8 horas o menos. Se combina pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo en un solo paso de 24 horas, enriqueciendo el alimento en un medio basal no selectivo

durante unas pocas horas, añadiendo posteriormente los agentes necesarios para hacerlo selectivo.

También en los años setenta, es modificado por Vassiliadis el medio de enriquecimiento selectivo original de Rappaport y se hacen numerosas investigaciones referentes a la naturaleza del daño y reparación celular.

En 1973, **Ames** y colaboradores desarrollaron el Test de Ames usando mutantes auxotróficos de *S. typhimurium* para probar la actividad mutagénica de compuestos químicos (Ames et al., 1973).

La técnica de anticuerpos fluorescentes es el primer método validado para la detección rápida de *Salmonella* por la Asociación Oficial de Química Analítica, Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos en 1975 (AOAC/FDA).

En 1978, los sistemas API 20, Enterotubo y Minitek son los primeros equipos de pruebas aprobados por la AOAC para la identificación rápida de aislamientos presuntivos de *Salmonella*.

La década de los ochenta puede ser descrita como la “*era de las pruebas de estuche*”. La AOAC ha descrito la prueba de estuche (*test kit*) como un sistema empaquetado que contiene los componentes claves para un particular método, pudiendo identificar una o más analíticas en una matriz o matrices dadas. Generalmente, estos componentes claves son propiedad y vienen preparados por el fabricante del estuche. En estos años se validan estuches para la identificación bioquímica rápida de *Salmonella*, y además se validan numerosos estuches para detección de *Salmonella* basados en filtración de membrana, enzimo-inmunoensayo, hibridización del ADN e inmunodifusión. También se desarrollan varias sondas genéticas para *Salmonella*.

En la década de los noventa ha continuado la validación de los estuches y de los métodos de instrumentación rápida. Se ha avanzado en el estudio molecular de la *Salmonella* mediante la utilización de diferentes métodos genotípicos tales como:

perfiles de plasmídicos (PP), análisis de endonucleasa de restricción del ADN cromosómico (REA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Estas técnicas han sido aplicadas a la investigación de la transmisión de *Salmonella* desde una fuente común, confirmando, por ejemplo, la importancia de la diseminación de *Salmonella* desde los animales al hombre; también han sido aplicadas a estudios de la transmisión de resistencia a antimicrobianos entre las salmonelas; estudio de las consecuencias del uso de antibióticos en la alimentación de animales; determinación de la extensión de un brote y evaluación de medidas preventivas.

El seguimiento de las salmonelas por técnicas moleculares está permitiendo conocer con suficiente especificidad la identificación de clonas de microorganismos a las que se les puede seguir la pista en el tiempo y en el espacio. Así también, nos están permitiendo conocer la continua evolución que sufren las cepas en la naturaleza, cambios que, por ejemplo, se reflejan en su lisogenia, bioquímica y contenido de ADN, lo que está siendo aprovechado por los epidemiólogos para defender hipótesis que no pueden ser probadas fácilmente por la epidemiología tradicional o por otras técnicas de laboratorio (Tacket, 1989; Gray et al., 1995).

I.2. TAXONOMÍA

Familia: *Enterobacteriaceae*

Tribu: *Salmonellae*

Género: *Salmonella*

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bastoncillos rectos, gram-negativos, la mayoría de ellos móviles, aunque puede haber algunas cepas que no lo son (*Shigella* y *Klebsiella*) y variantes inmóviles de especies móviles. Las especies móviles poseen flagelos peritricos, que los diferencian de los miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, que tienen flagelos polares. Algunas cepas de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Proteus* poseen fimbrias o pelillos. Estos últimos no son órganos de locomoción, son considerablemente más pequeños que los flagelos y no tienen relación antigénica con ellos.

Todas las especies fermentan la glucosa, son catalasa positiva y oxidasa negativa. Crecen bien en los medios de cultivo ordinarios y se encuentran formas aerógenas y anaerógenas. Es característica de algunos géneros la ausencia de gas en la fermentación de los hidratos de carbono. Por lo general, los nitratos son reducidos a nitrito. No se produce la reacción de la indofenol-oxidasa, ni la licuefacción del alginato. El pectato únicamente es licuado por miembros del género *Pectobacterium*.

La familia está compuesta por un grupo grande y diverso de microorganismos, estrechamente relacionados, con diferente estructura antigénica y propiedades bioquímicas. Los géneros, dentro de la familia se han establecido, principalmente, sobre la base de las características bioquímicas, mientras que las especies originales, muchos de cuyos nombres se mantienen, lo fueron sobre bases bioquímicas y ecológicas.

La complejidad antigénica de estas bacterias llevó al desarrollo, de esquemas antigénicos, elaborados según el esquema propuesto por Kauffman-White para

Salmonella, en el cual se mencionan numerosos serotipos. Muchos de estos serotipos son bioquímicamente similares y sólo pueden diferenciarse por métodos serológicos.

Las enterobacterias son organismos ubicuos que se encuentran en el suelo, el agua y la vegetación, y forman parte de la flora intestinal normal de la mayoría de los animales, incluyendo los humanos (Gray et al., 1995). Habitan, principalmente, en el tracto gastro-intestinal del hombre y de otros animales, de allí el nombre de la familia a la que pertenecen. Muchos son parásitos, otros saprófitos. Las especies patógenas para el hombre producen infecciones entéricas y septicémicas, por ello es interesante el poder efectuar una identificación relativamente rápida de las mismas.

Para esto se han desarrollado determinados medios de cultivo que facilitan el aislamiento e identificación de los patógenos (Finegold y Martin, 1983). Uno de estos medios es el Triple Azúcar Hierro (Kligler, TSI, KIA), llamado así por llevar tres azúcares: glucosa, lactosa, sacarosa, un indicador de pH (rojo fenol); y sulfato ferroso para demostrar la producción del SH₂ (ennegrecimiento).

La familia *Enterobacteriaceae* está subdividida en ocho grupos entéricos (aislados con afiliación de género no definida), dentro de los que se han descrito 27 géneros. Estos géneros se han clasificado sobre la base de homología del ADN, propiedades bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a bacteriófagos específicos de género y especie y patrones de susceptibilidad a los antibióticos (Gray et al., 1995).

La Tribu *Salmonellae* está compuesta por los géneros *Salmonella*, *Arizona* y *Citrobacter*. El género *Salmonella* agrupa a más de 2.200 serotipos diferentes, aún se continúan describiendo, comprendidos dentro de una única especie *Salmonella enterica* compuesta por siete subespecies que se corresponden con los cuatro subgéneros descritos por Kauffman (Vassiliadis et al., 1974; Papadakis et al., 1975; Burthandt et al., 1981; Shazaki et al., 1981; Le Minor y Bockemuhl, 1983; Tamura et al., 1983; Avril et al., 1995). Las diferentes subespecies son:

- subespecie I: *Salmonella enterica* subespecie *enterica*
- subespecie II: *Salmonella enterica* subespecie *salamae*
- subespecie IIIa: *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*
- subespecie IIIb: *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*
- subespecie IV: *Salmonella enterica* subespecie *houtenae*
- subespecie V: *Salmonella enterica* subespecie *bongori*
- subespecie VI: *Salmonella enterica* subespecie *indica*

La mayoría de ellas se denominan erróneamente especies, si bien este término es aceptado con fines prácticos debido a su amplia difusión en clínica. Estas subespecies también son denominadas serovares o serogrupos basándose en sus constituyentes antigénicos (*O*, *H* y *Vi*). La sub-especie I representa al 99,5% de todos los aislados patógenos de *Salmonella*.

Sin embargo, hay que decir que son diversas las clasificaciones utilizadas por los bacteriólogos y estas obedecen a una serie de propiedades bioquímicas, antigénicas, etc., comunes a determinadas cepas. Los esquemas clasificatorios más utilizados son:

- Clasificación de Kauffman
- Clasificación de Edwards y Ewing
- Clasificación de Kauffman-White
- Clasificación de Le Minor, Veron y Popoff
- Clasificación Ecológica
- Otras clasificaciones

I.2.1. CLASIFICACIÓN DE KAUFFMAN

Kauffman divide al género *Salmonella* en cuatro subgéneros, obedeciendo a las características bioquímicas que presentan las diferentes *Salmonellae*. Los caracteres bioquímicos empleados por este autor para su explicación se exponen en la Tabla 1 (Le Minor et al., 1982a ; Le Minor, 1984).

En el subgénero I se incluye la mayoría de las cepas patógenas para el hombre y animales de sangre caliente. Se han denominado serotipos o “*especies*”. Los subgéneros II, III y IV suelen encontrarse en animales de sangre fría, donde se comportan como comensales o flora saprófita. Algunos de ellos han recibido nombres; otros se conocen sólo por su fórmula antigénica. El subgénero III incluye los organismos conocidos como grupo *arizonae* (Gómez Lus, 1980; Collins y Lyme, 1989). El subgenero IV contiene serotipos raros, recibiendo denominación sólo algunos de ellos.

Tabla 1. Caracteres bioquímicos diferenciales para la Clasificación de *Salmonella* según Kauffman

Carácteres	Subgénero I	Subgénero II	Subgénero III	Subgénero IV
Dulcitol	+	+	-	-
Lactosa	-	-	+/x	-
ONPG	-	-/x	+	-
Salicina	-	-	-	+
d-tartrato	+	-/x	-/x	-/x
Mucato	+	+	d	-
Malonato	-	+	+	-
Gelatinasa	-	+	+	+
KCN	-	-	-	+

X = tardía e irregularmente positiva.

D = diferentes tipos de reacciones.

I.2.2. CLASIFICACIÓN DE EDWARDS Y EWING

También basada en las propiedades bioquímicas de *Salmonella*, reconoce exclusivamente tres especies:

- *S. choleraesuis* (especie tipo)
- *S. typhi*
- *S. enteritidis*

Con excepción de las dos primeras, al resto de las *Salmonellae* las considera serotipos de *S. enteritidis* (Gómez Lus, 1980; Harvey y Price, 1981; Benzanson et al., 1983).

A diferencia de la anterior clasificación, ésta considera *Arizona* como un género aparte de *Salmonella*, y *Arizona hinshawii* como la especie tipo. Los caracteres bioquímicos según esta clasificación se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracteres bioquímicos diferenciales para la Clasificación de *Salmonella* según Edwards y Ewing

Caracteres	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. enteritidis</i>
Sulfídrico (KIA)	+ o -	+	+
Citrato de Simmons	(+)	-	+
Ornitina	+	-	+
Gas (glucosa)	+	-	+
Dulcitol	D	D	+
Inositol	-	-	d
Trehalosa	-	+	+
Arabinosa	-	-	+
Ramnosa	+	-	+
Celobiosa	-	D	(+)
Mucato	-	-	+ o -

+ o - = Muchos cultivos positivos, algunas cepas negativas

(+) = Positiva después de 3 o más días

I.2.3. CLASIFICACIÓN DE KAUFFMAN-WHITE

Debido a la complejidad antigénica de los bacilos pertenecientes al género *Salmonella*, Kauffman y White, reunieron con fines prácticos en grupos o serogrupos, a salmonelas con un factor particular en común, considerado como característico de ese grupo. Desarrollando de esta manera un sistema para diferenciar una amplia variedad de serotipos por pruebas exhaustivas de adsorción cruzada y de reacción cruzada (Falkow y Mekalanos, 1996). Así, por ejemplo se sabe que: el factor “O” 2 caracteriza al Serogrupo A y el factor “O” 4 caracteriza al Serogrupo B.

Si bien ciertos factores “O” son característicos de un Serogrupo, por el contrario, otros son menos específicos y pueden encontrarse en varios Serogrupos, dando lugar a reacciones cruzadas. Tal es el caso del factor “O” 12, que lo poseen, por citar un ejemplo, todas las salmonelas de los Serogrupos A, B y D.

El esquema de Kauffman-White representa a los microorganismos por números y letras asignadas a los diferentes antígenos: *O* (somático), *Vi* (capsular) y *H* (flagelar); indicando sólo aquellos antígenos de importancia diagnóstica y no el registro completo del complejo antigénico (Le Minor, 1984). De esta forma se agrupan a todas las salmonelas de acuerdo a su estructura antigénica, quedando determinada toda una serie de fórmulas para los serotipos. Salvo raras excepciones a cada fórmula le corresponde un serotipo (Perea, 1983; Le Minor, 1984; Pumarola, 1984).

La fórmula antigénica, por ejemplo, *S. typhi* 9,12, [Vi]:d- significa que esta bacteria posee los factores O:9 mayor y 12 accesorio, que puede poseer el antígeno Vi, indicado entre corchetes. Los dos puntos separan los antígenos somático y capsular de los flagelares; en este caso el antígeno flagelar de fase 1:d y no posee antígeno flagelar de fase 2, lo que se indica con el guión al final de la fórmula. (Le Minor, 1984). Algunas fórmulas antigénicas de serotipos aislados con frecuencia se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Fórmulas antigénicas de algunos serotipos de *Salmonella* según la Clasificación de Kauffman-White

Serogrupo	Serotipo	Antígeno “O”	Antígeno “Vi”	Antígeno “H”	
				Fase 1	fase 2
A	<i>S. paratyphi A</i>	1, 2, 12	-	a	-
B	<i>S. paratyphi B</i>	1, 4, (5), 12	-	b	1, 2
	<i>S. typhimurium</i>	1, 4, (5), 12	-	i	1, 2
	<i>S. heidelberg</i>	1, 4, (5), 12	-	r	1, 2
C1	<i>S. paratyphi C</i>	6, 7	+	c	1, 5
	<i>S. infantis</i>	6, 7	-	k	1, 5
	<i>S. thompson</i>	6, 7	-	r	1, 2
	<i>S. virchow</i>	6, 7	-	r	1, 2
C2	<i>S. newport</i>	6, 8	-	r	1, 5
	<i>S. bovismorbificans</i>	6, 8	-	r	1, 5
	<i>S. hadar</i>	6, 8	-	z10	e,n,x
D	<i>S. typhi</i>	9, 12	+	d	-
	<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12	-	g, m	-
E	<i>S. anatum</i>	3,10	-	e,h	1,6
	<i>S. london</i>	3,10	-	l,v	1,7
G2	<i>S. worthington</i>	1,13,23	-	z	l,w

I.2.4. CLASIFICACIÓN DE LE MINOR, VERON y POPOFF

Aplicando taxonomía numérica a los caracteres fenotípicos y genómicos (hibridación ADN/ADN) de *Salmonella*, estos autores han demostrado que el género no comprende más de una especie, para ellos *Salmonella choleraesuis*, con seis subespecies (Le Minor, 1984):

- Subespecie *choleraesuis*, correspondiente al Subgénero I de Kauffman
- Subespecie *salamae*, correspondiente al Subgénero II de Kauffman
- Subespecie *arizonae*, correspondiente a los serotipos monofásicos del Subgénero III de Kauffman
- Subespecie *diarizonae*, que corresponde a los serotipos difásicos del Subgénero III de Kauffman
 - Subespecie *houtenae*, correspondiente al Subgénero IV de Kauffman
- Subespecie *bongori*, compuesta por las cepas que son dulcitol, betagalactosidasa y sales de cianuro positivas

I.2.5. CLASIFICACIÓN ECOLÓGICA

Esta basada en la preferencia por determinados hospedadores y la capacidad de adaptación que presentan los serotipos (Perea, 1983):

- **Grupo 1:** Serotipos muy adaptados al hombre: *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* y *S. paratyphi C*. Estas salmonelas tienen como reservorio único al hombre y, excepcionalmente, afectan algún animal.

- **Grupo 2:** Serotipos muy adaptados a hospedadores específicos no humanos. Son serotipos adaptados a diferentes especies animales, tal como es el caso de *S. gallinarum*, y *S. pullorum* (gallinas y pollos), *S. dublin* (vacas), etc. Algunas suelen producir infecciones en humanos y requieren un gran inóculo para tener capacidad infectante.

- **Grupo 3:** Serotipos no adaptados a hospedadores específicos. Comprende más de 2.000 serotipos de amplia distribución en la naturaleza y que producen por lo general cuadros gastroentéricos de corta duración. Rara vez dan lugar a bacteriemias. Suelen ser responsables de más de un 80% de las infecciones por *Salmonella*.

I.2.6. OTRAS CLASIFICACIONES

Con fines epidemiológicos, los serotipos de *Salmonella* pueden ser divididos según se empleen, métodos fenotípicos o métodos genotípicos. En el caso de los fenotípicos los aislados pueden ser subdivididos en: biotipos, bacteriocinotipo, antibiotipos y fagotipos y en el caso de los genotípicos en: perfiles plasmídicos, patrones de restricción, ribotipos, etc. Cada uno de estos métodos será descrito más adelante en el apartado referente al diagnóstico.

I.2.7. EVOLUCIÓN DE LA NOMENCLATURA

Los nombres dados a *Salmonella* no han seguido las normas usuales de la nomenclatura. Al comienzo, y siguiendo el principio de la nomenclatura linneana, el nombre se formaba asociando la enfermedad con el origen zoológico (Frobisher, 1978; Falkow y Mekalanos, 1996). Así, por ejemplo, el microorganismo responsable del proceso tifoideo en roedores recibió el nombre de *S. typhimurium*.

Esta forma de denominar las nuevas “*especies*” fue abandonada puesto que el nombre asignado al microorganismo dejaba suponer una especificidad de hospedador, lo cual no siempre era cierto (López-Brea, 1980; Le Minor et al., 1982b).

Cuando Kauffman subdivide el género *Salmonella* en cuatro subgéneros no les asigna ningún nombre especial. Los serotipos pertenecientes a cada uno de estos subgéneros recibirán un nombre en función de su fórmula antigénica y siguiendo el esquema establecido por Kauffman y White.

En 1.966, el Subcomité de *Enterobacteriaceae*, decide que para designar en adelante a los nuevos serotipos del subgénero I, había que añadirle un epíteto que indicase el origen geográfico de la primera cepa aislada. Por ejemplo, *S. biafra* y *S. panama*; los nuevos serotipos de los otros subgéneros serían asignados por su fórmula antigénica. Sin embargo, ciertos serotipos de los subgéneros II y IV habían recibido nombres antes de la decisión de 1.966: *S. bilthoven* del subgénero II y *S. houten* del subgénero IV.

Ese mismo año, Ewing propone una nueva clasificación, modificando la anteriormente realizada por Kauffman. Ewing, la clasifica en tres especies, a saber *S. choleraesuis* (especie tipo), *S. typhi* y *S. enteritidis*. Esta última agruparía a todos los serotipos de *Salmonella*, exceptuando *S. choleraesuis* y *S. typhi*. La especie sería escrita en los caracteres itálicos o bien subrayando el nombre, mientras que el

serotipo estaría representado en caracteres romanos y su primera letra iría en mayúscula. Ejemplo, *S. enteritidis* ser. Typhimurium.

Hasta 1.970, la taxonomía de *Salmonella* y la nomenclatura existente por entonces, se basaba únicamente en el estudio de los caracteres bioquímicos y antigénicos. Ese mismo año, Le Minor et al. (Moustardier, 1976), subdividen el género en cuatro especies que se corresponderían con los subgéneros de Kauffman. Estas son:

- *S. kauffmanni*: subgénero I de Kauffman
- *S. salamae*: subgénero II de Kauffman
- *S. arizonae*: subgénero III de Kauffman
- *S. houtenae*: subgénero IV de Kauffman

La nomenclatura propuesta por estos autores para su clasificación sería:

- Para los serotipos pertenecientes al subgénero I de Kauffman: *S. kauffmanni* ser typhimurium, etc.
- Para los serotipos pertenecientes a los otros subgéneros: *S. salamae*, *S. arizonae* o *S. houtenae*, seguido de la fórmula antigénica. Por ejemplo: *S. salamae* 13, 22 : Z₃₉ : 1, 5, 7.

En 1.973, los estudios genómicos (hibridación ADN/ADN) llevados a cabo por Crosa y colaboradores, y años más tarde, por Storey y colaboradores (Le Minor et al., 1982a), mostraron que las salmonelas del subgénero I, III (Arizona) monofásicas, III difásicas y IV, estaban reunidas en grupos de hibridación diferentes y que era posible cuantificar los parentescos genómicos entre estos grupos.

En 1.982, Le Minor y colaboradores realizan el estudio de los caracteres fenotípicos y genómicos de un amplio grupo de salmonelas pertenecientes a los subgéneros I, II, III y IV de Kauffman, así como un número de cepas atípicas: grupo bongor. El análisis de los resultados, en taxonomía numérica, les permitió reconocer

siete grupos fenotípicos y seis grupos genómicos (Le Minor et al., 1982a). La correlación existente entre los resultados de los dos métodos les llevó a dividir *Salmonella* en 6 taxones (*Taxón: grupo formado por la combinación de caracteres fenotípicos y genómicos*). Basado en este estudio, *Salmonella* constituiría una especie única que comprendería 6 sub-especies a su vez subdivididas en serotipos.

Estos autores proponen, conforme a las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana (CINB), la siguiente nomenclatura para el género *Salmonella* (Le Minor et al., 1982b):

- Especie única *S. choleraesuis*

- Para el taxón 1: *S. choleraesuis* subespecie choleraesuis. Se correspondería con el subgénero I de Kauffman

- Para el taxón 2: *S. choleraesuis* subespecie salamae. Se correspondería con el subgénero II

- Para el taxón 3: *S. choleraesuis* subespecie arizonae. Este taxón agruparía los serotipos monofásicos del subgénero III

- Para el taxón 4: *S. choleraesuis* subespecie diarizonae. Agruparía los serotipo difásicos del subgénero III

- Para el taxón 5: *S. choleraesuis* subespecie houtenae. Se correspondería con el subgénero IV

- Para el taxón 6: *S. choleraesuis* subespecies bongori

Los serotipos de la primera subespecie continuarían siendo designados por un nombre, el cual no sería escrito en caracteres itálicos o subrayado. Por ejemplo: *S. choleraesuis* subespecie choleraesuis ser typhimurium.

Una nomenclatura abreviada de la anterior ha sido propuesta por los mismos autores con el objeto de simplificarla para el trabajo rutinario de laboratorio y poder adaptarla al esquema de Kauffman-White. Esta nomenclatura no está acorde al Centro Internacional de Nomenclatura Bacteriana (CINB) y los serotipos no deben ser escritos en caracteres itálicos ni subrayados. Los serotipos pertenecientes a la primera subespecie continuarán siendo designados por sus nombres actuales. Los de las otras subespecies serían designados por la combinación *S. salamae*, *S. hotenae* o *S. bongori*, seguido del serotipo más la fórmula antigénica.

I.3. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS GENERALES

Las salmonelas son gérmenes gram-negativos con forma de bacilos rectos que miden de 0,5 a 0,8 micras de ancho por 1-3 micras de largo, no forman esporas ni tienen cápsula excepto cuando están en fase M. (Gómez Lus, 1980).

Aunque la mayoría de las salmonelas son móviles, gracias a flagelos peritricos, pueden existir mutantes no móviles como, por ejemplo, los serotipos *S. gallinarum* y *S. pullorum* que siempre son inmóviles (Gómez Lus, 1980; Le Minor, 1984).

Los flagelos han podido ser observados con el microscopio electrónico y coloraciones especiales en los gérmenes que los poseen (Zapatero, 1974).

Crece bien sobre medios de cultivo ordinarios, sin precisar para ello requerimientos nutritivos adicionales. Se cultivan bien a un pH entre 6 y 8 con una temperatura óptima de 37° C, pero también se pueden cultivar entre 4 y 38 °C (Zapatero, 1974; Gómez Lus, 1980).

Son gérmenes aerobios y anaerobios facultativos. En aerobiosis los cultivos son exuberantes, mientras que en anaerobiosis son más pobres y además necesitan cierto grado de humedad para desarrollarse (Zapatero, 1974).

En medios líquidos, los gérmenes en fase lisa (forma S) dan cultivos rápidos que enturbian el medio y forman un ligero velo en la superficie. Cuando se encuentran en fase rugosa (forma R) producen un depósito granuloso con líquido claro sobrenadante.

En agar nutritivo a las 18-24 horas, forman colonias redondeadas entre 2-4 mm de diámetro, aunque ciertos tipos de salmonelas pueden formar, inusualmente, pequeñas colonias de menos de 1 mm (Gómez Lus, 1980).

Las colonias suelen ser plano-convexas, húmedas y de superficie lisa y brillante (forma S); o colonias irregulares, planas, mates y rugosas (forma R) (Gómez Lus, 1980; Le Minor, 1984).

En agar *Salmonella-Shigella* (SS) y desoxicolato-citrato son transparentes, por ser lactosa negativas (Gómez Lus, 1980).

En agar verde brillante aparecen colonias blanco-rosáceas, opacas, con el medio que las rodea rojo, diferenciándose de las de gérmenes lactosa y sacarosa positivos, que son amarillo verdosas, tonalidad que tiene también el medio circundante (Gómez Lus, 1980).

En el agar sulfito bismuto las colonias de *S. typhi* son de color negro, con brillo metálico y las de otras salmonelas, negras o verdes (Gómez Lus, 1980).

I.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Las salmonelas presentan una marcada resistencia a las condiciones ambientales. Resisten al frío y a la congelación, en el hielo y la nieve persisten viables más de tres meses (Gómez Lus, 1980).

En el agua pueden sobrevivir durante 2 a 3 semanas y persisten aún más tiempo si ésta contienen materia orgánica en suspensión (Gómez Lus, 1980).

Son resistentes a la desecación, lo cual explica su supervivencia en el suelo y en el lodo hasta por seis semanas (Zapatero, 1974).

Resisten bien a determinados agentes químicos, tales como colorantes (verde malaquita, fucsina, cristal violeta), bilis o sales biliares, tetracionato etc., que suelen emplearse al elaborar los medios selectivos para su aislamiento (Hoben et al., 1973; Zapatero, 1974; Restaino y Komatsu, 1982; Restaino et al., 1982; Falkow y Mekalanos, 1996).

En contraste, son sensibles al calor (mueren a 56° C durante 1 hora), a los antisépticos ordinarios y a los medios usuales de desinfección: pasteurización, cloración, etc. (Joklik et al., 1986).

I.5. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

- **Las salmonelas fermentan la glucosa, manitol, sorbitol y maltosa**
- **No fermentan la lactosa, sacarosa, salicina ni el inositol**
- **Usualmente producen gas a partir de la glucosa**
- **Reducen los nitratos a nitrito**
- **Producen de forma irregular sulfuro de hidrógeno (H₂S) en medios como el agar Triple Azúcar Hierro (TSI) o agar Hierro de Kligler (KIA)**
- **No hidrolizan la urea ni desaminan el triptófano y la fenilalanina**
- **No producen indol, acetoina, betagalactosidasa, lipasa ni desoxirribonucleasa.**
- **La reacción del rojo de metilo es siempre positiva**
- **Por lo general, descarboxilan la lisina y la ornitina**
- **No suelen licuar la gelatina**
- **La mayoría son malonato negativas**
- **Tienen capacidad tetrionato reductasa**
- **Son capaces, generalmente, de utilizar el citrato como única fuente de carbono.**
- **El porcentaje G+C del DNA es de 50-53 (Le Minor, 1984).**

I.6. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS ATÍPICAS

I.6.1. LACTOSA: Se han descrito cepas de *Salmonella lactosa* (+), tales como:

- *S. typhi* (Le Minor, 1977; Kohbata et al., 1983).
- *S. typhimurium* (Blackburn y Ellis, 1973; Le Minor et al., 1974; Le Minor, 1977; Thadepalli, 1980).
- *S. anatum*, *S. tennessee* y *S. senftenbergh* (Le Minor, 1977; Sharma et al., 1984).
- *S. indiana*, *S. java* y *S. toulon* (Threlfall et al., 1983)
- *S. newington* (Le Minor, 1977).
- *S. newport* (Anad y Finlayson, 1980).
- *S. oranienburg* (Le Minor et al., 1974).
- *S. arizonae*, que suele fermentar la lactosa rápida o lentamente (Le Minor, 1977; Le Minor, 1984; Tanpaichitra et al., 1984).
- *S. virchow*, cepas lactosa (+) causantes de brotes alimentarios e infecciones sistémicas en niños, ocurridas en diferentes regiones españolas, debido a la ingestión de fórmula láctea infantil contaminada (Ruíz et al., 1995; Usera et al., 1996; Usera et al., 1998).

I.6.2. INDOL: han sido aisladas, excepcionalmente, variantes indol (+) de:

- *S. nima*, *S. huittigfoss*, *S. anatum* y *S. bareilly* (Le Minor, 1977).
- *S. enteritidis* y *S. panama* (Freeman, 1983).
- *S. gassi* y *S. gori* (Le Minor et al., 1969).
- *S. samaru* (Le Minor et al., 1983).
- *S. eastbourne* (Le Minor et al., 1977; Freeman, 1983).

- *S. gafsa* (Le Minor et al., 1981).
- También han sido aisladas cepas pertenecientes a los subgéneros II y III de Kauffman, productoras de indol (Lhuillier y Zeller, 1977; Le Minor et al., 1980; Le Minor et al., 1981).

I.6.3. LISINA DESCARBOXILASA (LDC): La reacción de la lisina-descarboxilasa es positiva para la mayoría de las cepas de *Salmonella*; una excepción importante es:

- *S. paratyphi A* (Moustardier, 1976; Le Minor, 1977; Freeman, 1983; Le Minor y Bockemuhl, 1983; Le Minor, 1984; Pumarola, 1984).

I.6.4. ORNITINA DESCARBOXILASA (ODC): *S. typhi* es siempre ornitina-descarboxilasa negativa (Le Minor, 1977; Le Minor, 1984).

I.6.5. SULFURO DE HIDRÓGENO (H₂S): La mayoría de las salmonelas producen H₂S, pero unos pocos serotipos pueden no hacerlo, este es el caso de:

- *S. paratyphi A*, que por lo regular no lo produce (Le Minor, 1977; Le Minor, 1984; Pumarola, 1984)
- Tampoco lo hacen algunas cepas de *Salmonella choleraesuis* (Le Minor, 1984).

I.6.6. CITRATO: Casi todas las cepas de *Salmonella* son capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono, exceptuando:

- *S. typhi* y *S. paratyphi A* (Moustardier, 1976; Le Minor, 1977; Le Minor, 1984).

I.6.7. PRODUCCIÓN DE GAS: La mayoría de las salmonelas son aerogénicas; es decir producen gas a partir de la glucosa, sin embargo:

- *S. typhi* nunca lo hace (Wiesman, 1974; Buttiaux et al., 1976; Moustardier, 1976; Le Minor, 1977; Frobisher et al., 1978; Thadepalli, 1980; Hornick, 1982; Freeman, 1983; Le Minor, 1984; Pumarola, 1984).
- Pueden producirse variantes anaerogénicas de serotipos que normalmente producen gas, como es el caso de *S. dublin* (Le Minor, 1977; Le Minor, 1984).

I.6.8. MALONATO: Normalmente las salmonelas no utilizan el malonato, pero han sido aisladas cepas de *Salmonella* capaces de utilizarlo, por ejemplo:

- *S. gassi* y *S. gori* (Le Minor et al., 1969).
- *S. everleigh* (Le Minor y Bockemuhl, 1983).
- *S. samaru* y *S. gafsa* (Le Minor et al, 1981; Le Minor et al., 1983).
- *S. arizonae* (Le Minor, 1984).
- Cepas del subgénero II de Kauffman (Papadakis et al., 1975; Le Minor y Bockemuhl, 1983).

I.6.9. SALES DE CIANURO (KCN): Los miembros del género *Salmonella* no suelen desarrollarse, por lo general, en medios que contengan sales de cianuro; no obstante, han sido descritos algunos serotipos que si pueden crecer en ellos:

- *S. malawi* y *S. campinense* (Le Minor y Bockemuhl, 1983).
- *S. bongor* (Le Minor et al. 1969).

I.6.10. BETA-GALACTOSIDASA (ONPG): si bien la mayoría de las salmonelas no posee actividad betagalactosidasa, *S. arizonae* es betagalactosidasa (+). (Le Minor, 1977; Le Minor, 1984; Tanpaichitra et al., 1984).

I.7. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Salmonella posee antígenos somáticos, flagelares y capsulares o de superficie.

I.7.1. ANTÍGENO SOMÁTICO “O”

El antígeno *O*, cuyo nombre viene del alemán *ohne hauch* que significa no diseminado o somático, son propios de las salmonelas en fase lisa (S); se encuentran localizado en la pared celular de la bacteria y químicamente son de naturaleza lipopolisacárida. Las cadenas *O* específicas, determinan la especificidad serológica de cada lipopolisacárido y son la base clasificatoria de las salmonelas, consisten en unidades de repetición (oligosacáridos), que se encuentran unidas al núcleo basal de polisacárido (idéntico o bastante similar en casi todas las salmonelas), que a su vez está unido al lípido A (Moustardier, 1976; Finegold y Martin, 1983; Pumarola, 1984; Falkow y Mekalanos, 1996).

Es termoestable y resistente a la acción del alcohol y del ácido fénico (Wiesman, 1974; Moustardier, 1976; Del Rio Mapelli et al., 1980; Gómez Lus, 1980; Lindberg y Le Minor, 1984; Pumarola, 1984;). Puede ser extraído por el ácido tricloroacético y por solubilización en dietilenglicol (Moustardier, 1976).

El antígeno “O” constituye la endotoxina del microorganismo, está involucrado en la patogenicidad del mismo, ya que favorece la capacidad de adhesión de las salmonelas a las células intestinales del huésped y la sobrevivencia intracelularmente y tiene un poder inmunizante importante. Produce una aglutinación granular, fina, lenta y difícil de disociar por agitación (Joklik et al., 1986).

En la serología de *Salmonella*, este antígeno es el primero que se determina. El complejo de antígenos *O*, hay más de 60 antígenos, determina el subgrupo somático al que pertenece el microorganismo (Finegold y Martin, 1983). Cada antígeno *O* se encuentra constituido por dos o tres factores serológicamente separables (*determinantes*) cada uno denominado con un número; los antígenos

compartidos por algunos, pero no todos los de un conjunto particular, exhiben reacciones cruzadas. Los antígenos *O* que comparten un importante determinante se clasifican como serogrupo; los primeros descritos se nombraron con letras de la A-Z y los siguientes con números a partir del 51.

Esto ha permitido dividir a las salmonelas en más de 2.200 serotipos incluidos en unos 40 grupos, donde los organismos más frecuentes están englobados en los primeros seis grupos. Los miembros de cada grupo *O* se diferencian en serotipos, basándose en determinaciones adicionales y en los antígenos flagelares (Collins y Lyme, 1989; Falkow y Mekalanos, 1996).

I.7.2. ANTÍGENO SOMÁTICO “M”

Poco importante en relación con los otros antígenos, se encuentra presente en aquellas salmonelas en fase mucoide (*M*) o también llamada rugosa (*R*), especialmente en *S. paratyphi B*.

Resiste a la acción del formol y el calentamiento a 60° C, pero es destruido por el alcohol y el ácido clorhídrico (Moustardier, 1976; Le Minor, 1977; Gómez Lus, 1980).

Se desarrolla abundantemente haciendo crecer *Salmonella* a bajas temperaturas o en medios con elevadas concentraciones salinas (Lindberg y Le Minor, 1977).

El antígeno “*M*” puede causar aglutinación bacteriana o ser precipitado cuando reacciona con un antisuero –*M* (Lindberg y Le Minor, 1977).

Este antígeno parece ser común a todos los serotipos de *Salmonella*, existe en las fases mucoides (*R*) desprovistas de antígeno “*O*” y también en las fases lisas (*S*, del inglés *smooth*), donde se encuentra situado profundamente y cubierto por el antígeno “*O*”. Carece de interés en la serología de *Salmonella* (Moustardier, 1976; Le Minor, 1977; Del Rio Mapelli et al., 1980; Gómez Lus, 1980).

I.7.3. ANTÍGENOS FLAGELARES “H”

Los antígenos flagelares, cuyo nombre se deriva del alemán *hauch* que significa diseminados, están presentes en las formas móviles de *Salmonella*. Son de naturaleza proteica, termolábiles y se destruyen por la acción del alcohol, ácidos y fermentos proteolíticos. Se conservan mediante la acción de formol (Wiesman, 1974; Finegold y Martin, 1983).

Se obtienen cultivando *Salmonella* en medios líquidos o semisólidos, pero no se desarrollan sobre medios sólidos fenicados.

Una cepa dada puede elaborar en momentos diferentes cada uno de las diferentes formas o fases del antígeno H :

- **Fase 1**, llamada *específica*, los antígenos de fase 1 son compartidos sólo por unos pocos microorganismos y reaccionan únicamente con antisueros homólogos.
- **Fase 2**, denominada *inespecífica* o *no específica*, son compartidos por muchos microorganismos y pueden presentar reacción cruzada con antisueros heterólogos.

Los antígenos “H” en fase 1 se designan por las letras minúsculas seguidas o no de un número y cuando están en fase 2 por números arábigos (Collins y Lyme, 1989).

Atendiendo al antígeno flagelar, los cultivos de *Salmonella* pueden ser:

- **Monofásicos:** cuando todas están en una fase única. Estas cepas pueden estar en fase 1 (*específica*) o en fase 2 (*inespecífica*). Ejemplos de cepas monofásicas los son: *S. typhi* y *S. paratyphi A*.

- **Difásicos:** cuando el antígeno flagelar puede presentarse alternativamente en fase 1 (*específica*), característica del serotipo, o en fase 2 (*inespecífica*), común a varios serotipos.

Dicha variación de fase, depende de una ordenación reversible del ácido desoxirribonucleico (ADN), y puede verse acentuada al hacer crecer los microorganismos en suero que contenga anticuerpos frente a los antígenos flagelares, lo que favorecerá el desarrollo de mutantes con el antígeno alternativo (alélico) que no reaccionará con el antisuero (Falkow y Mekalanos, 1996). Esta situación se da en especial si el cultivo se incuba más de 24 horas). *S. paratyphi B* es un ejemplo de salmonela difásica.

Si tomamos un cultivo bacteriano de una cepa difásica, en él se hallarán salmonelas que tengan sus antígenos “H” en fase 1 y otras que los tengan en fase 2, pero nunca una misma bacteria presentará a la vez los dos tipos de antígenos “H”.

Si se realiza un cultivo puro de una cepa de salmonela difásica que tenga sus antígenos flagelares en fase 1, en la población descendiente aparecerá con una frecuencia de 10^{-3} - 10^{-5} bacterias con antígenos flagelares “H” en fase 2. A este fenómeno se le conoce como *variación difásica*.

Si cultivamos una cepa de salmonela difásica con antígenos flagelares en fase 1 y fase 2 en un medio semisólido que contenga un antisuero flagelar “H” que neutralice una de las dos fases, se inmobilizarán las bacterias que posean ese antígeno pero no las que poseen el otro, las cuales invadirán el medio. Si se realiza la experiencia a la inversa, obtendremos una población bacteriana que contiene el otro antígeno flagelar. Esta técnica se denomina *inversión de fase* y permite la identificación completa de los serotipos de *Salmonella*.

El antígeno “H” produce una aglutinación algodonosa, rápida fácilmente separable por agitación. Este antígeno no juega ningún papel en el poder patógeno de la cepa, ni en el poder inmunizante de la *Salmonella*.

I.7.4. ANTÍGENO “VI”: CAPSULAR O DE SUPERFICIE

Este antígeno rodea la pared celular de la bacteria enmascarando al antígeno somático “O” y convirtiendo a la cepa en inaglutinable frente a los antisueros “O”.

De naturaleza termolábil, se pierde al calentar una suspensión bacteriana hasta el punto de ebullición durante 10 minutos, volviéndose la suspensión aglutinable frente a los antisueros “O”. No se destruye por el alcohol ni por la acción del formol y puede ser extraído por el ácido tricloroacético.

Se encuentra presente en los cultivos bacterianos recién aislados y desaparece rápidamente en subcultivos. El antígeno *Vi* de *S. typhi* es un homopolímero del ácido N-acetilgalactosaminurónico. En otras salmonelas existen otros antígenos *Vi* (Falkow y Mekalanos, 1996).

Es responsable de una aglutinación glanular, muy fina, lenta y difícilmente dissociable. Este antígeno puede servir para proteger al antígeno *O* de antisueros y convierte a las cepas que lo poseen en más resistentes a la fagocitosis (Joklik et al., 1986). Es menos tóxico que el antígeno “O” para los animales de laboratorio y juega un papel importante en la inmunización.

I.8. EPIDEMIOLOGÍA

I.8.1. RESUMEN HISTÓRICO

La Epidemiología de las infecciones por *Salmonella* puede ser dividida en tres períodos:

- Desde finales de los años 1.880 a 1.949, la fiebre tifoidea causada por *S. typhi* fue el tipo de infección predominante en humanos en Estados Unidos y el resto del mundo.

- De 1.950 a 1.969 esta severa infección se hizo relativamente rara. La típica enfermedad causada por *Salmonella* en humanos cambió de fiebre tifoidea, una infección sistémica, a gastroenteritis con marcada diarrea, fiebre, dolor abdominal y rara invasión sistémica. Los mayores brotes en esta época ocurrieron en hospitales.

- A partir de los años 70, se ha caracterizado por un constante aumento de las salmonelas no typhi-paratyphi en humanos y grandes brotes por contaminación de alimentos de origen animal han reemplazado a los brotes en hospitales. En lo sucesivo denominaremos a este grupo de salmonelas no typhi-paratyphi como salmonelas no typhi, es decir salmonelas diferentes a *S. typhi* o *paratyphi*.

I.8.2. CADENA EPIDEMIOLOGICA

I.8.2.1. RESERVORIO Y FUENTE DE INFECCIÓN

Las salmonelas se encuentran, prácticamente, en todos los animales, tanto domésticos como salvajes, incluyendo aves de corral, ganado vacuno y porcino, reptiles, roedores, mamíferos silvestres y mascotas como tortugas, perros, gatos y también en los humanos, por ejemplo, pacientes, portadores convalescientes y, especialmente, los casos leves o desconocidos. Los portadores crónicos son raros en el caso de los humanos pero prevalentes en animales y aves. El reservorio animal se mantiene por contacto entre animales y por el empleo de piensos contaminados con *Salmonella* (Gray, 1995).

Para estudiar la epidemiología de las salmonelas resulta útil agruparlas según su preferencia por un huésped determinado (clasificación ecológica): serotipos de salmonela altamente adaptados al hombre, salmonelas extremadamente adaptadas a hospedadores específicos salvo el hombre y salmonelas con una amplia gama de hospedadores. A estas últimas dedicaremos nuestra atención, puesto que la mayoría de las salmonelas pertenecen a esta categoría y son causa de gran parte de las infecciones alimentarias.

En contraste con *S. typhi*, la incidencia de salmonelas no typhi ha aumentado dramáticamente a partir de la década de los ochenta en Estados Unidos (Martin et al., 1987; Chalker y Blaser, 1988; CDC, 1991). Alrededor de 10 de los más de 2.000 serotipos de *Salmonella* constituyen la mayoría de los aislados humanos cada año. A pesar del aumento en el aislamiento de *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, es todavía, por sí sola, la causa más frecuente de gastroenteritis, bacteriemia y portador asintomático de *Salmonella* en el mundo. Otros serotipos comunes en humanos son *S. enteritidis*, *S. newport*, y *S. heidelberg*, y su frecuencia relativa varía en el tiempo y según la zona geográfica (Falkow y Mekalanos, 1996).

Tanto las personas como los animales pueden ser directa o indirectamente la fuente de contaminación de los alimentos con *Salmonella*. En el caso de los animales (fuente heteróloga), estos pueden ser salvajes o domésticos (en los que se ha estimado una tasa de infección entre 1-3%). También pueden verse involucrados las aves de corral, porcinos, bovinos, roedores y animales caseros como tortugas, polluelos, perros y gatos.

Los animales productores de carne y las aves de corral son, en general, los que se encuentran comprometidos con mayor frecuencia. De todos el pollo y sus derivados pueden ser los más importantes. Se ha demostrado que la *Salmonella* puede pasar transováricamente de las gallinas a los huevos, representando los huevos frescos intactos un riesgo (Editorial Nature, 1988; St. Louis et al., 1988). La transmisión vertical se da en las granjas de crianza y de ponedoras; mientras que la transmisión horizontal se da en todo tipo de granjas.

El reservorio humano (fuente homóloga) tiene fundamental interés en relación con la manipulación de los alimentos y el contagio directo con alimentos contaminados como resultado de la colonización animal o durante su procesamiento. Sabemos que muchas epidemias de salmonelosis han tenido su origen en portadores involucrados con la atención de pacientes, especialmente niños, o con la preparación de alimentos o la leche. La gran mayoría de portadores de *Salmonella* y otros agentes patógenos intestinales nunca se descubren, al ser estos casos leves no identificados y portadores sanos o convalecientes. Como regla sólo se conocen aquellos que han sido causa de otros casos de enfermedad, a menos que se realice una investigación especial con el auxilio del laboratorio de bacteriología (Fuerts, 1978).

I.8.2.2. MECANISMO DE TRANSMISIÓN

La presentación suele ser de carácter epidémico con un antecedente común, el consumo de productos alimentarios contaminados, que suelen representar la principal fuente de infección para los humanos. Los brotes pueden ser causados por diversos serotipos relacionados con el consumo de diferentes alimentos, tales como huevos, leche no pasteurizada, frutas y vegetales (St. Louis et al., 1988; Cowden et al., 1989; Hedberg et al., 1991; Mishu et al., 1991). La investigación epidemiológica de un brote suele detectar el lavado inapropiado de las manos, una refrigeración inadecuada de alimentos preparados mucho antes de servirse o una cocción insuficiente de productos alimentarios de origen animal, especialmente aves de corral.

Sobre todo en países desarrollados la salmonelosis está íntimamente relacionada con aves de corral, huevos (contaminados por la bacteria tanto en su superficie externa, como en el interior) y productos lácteos. El consumo de alimentos con huevos crudos o poco cocidos aumenta de forma substancial el riesgo de infección (Gray, 1995; Miller et al., 1995). Aproximadamente el 50% de los pollos en Estados Unidos tienen cultivos positivos a *Salmonella*. (Miller et al., 1995). La adquisición de *Salmonella* ha sido asociada con la práctica de cocinar las aves lentamente a bajas temperaturas, especialmente cuando la cavidad del ave se rellena con ingredientes que pueden soportar el crecimiento de los microorganismos (Editorial Nature, 1988; St. Louis et al., 1988).

El origen de la contaminación por *Salmonella* de los alimentos de procedencia animal es variado, estos pueden contener microorganismos desde el momento de su obtención, como consecuencia de que los animales productores padecieran salmonelosis de forma subclínica o, simplemente, fueran portadores sanos de *Salmonella*. La causa de este hecho está relacionado con los sistemas actuales de manejo, transporte y producción intensiva y otros factores epizootiológicos. Los animales de abasto tienen mayores oportunidades de infección, dado el consumo de piensos cuya composición consta de harinas de pescado, harinas de carnes

desechadas para el consumo humano y otros productos secundarios de animales infectados.

La transmisión animal-animal puede ocurrir no sólo en los criaderos de origen, sino también durante el tránsito a mataderos. En un estudio de la prevalencia ambiental de *Salmonella* en mataderos de ganado ovino, Caro y colaboradores, aislaron *Salmonella* en el 35.7% de los locales de sacrificio investigados. Los puntos que correspondían a zonas de sacrificio y faenado, suelo de la sala de evisceración y zona de mondonguería, fueron las localizaciones donde se identificaron mayor número de serotipos de *Salmonella* (Caro et al., 1991).

A las causas de incremento de la salmonelosis en los últimos años podríamos además añadir la contaminación cruzada, los problemas de estrés debido a la espera obligada antes del sacrificio que en muchos casos aumenta el porcentaje de infección por *Salmonella* y la posible contaminación de productos cárnicos obtenidos. Todos estos factores representan un problema continuo requiriendo atención cada eslabón de la cadena. Autores como Spillman y Ehram (1983), enfatizan la necesidad de mantener limpio el medio, así como el establecimiento de condiciones higiénicas adecuadas para la prevención eficaz de la contaminación.

Durante el sacrificio pueden producirse condiciones que favorecen una diseminación vía hemática de las salmonelas desde el tracto gastrointestinal hacia los diferentes tejidos; estas circunstancias vienen determinadas por un fallo en las condiciones de la barrera intestinal que se ve superada en la agonía, con lo que los numerosos microorganismos presentes en el contenido intestinal, entre ellos *Salmonella*, pasan al torrente circulatorio y se diseminan.

Después del sacrificio, son numerosos los factores que pueden influir o intervenir en una posible contaminación por *Salmonella*, de todos ellos la zona de evisceración y preparación de la canal son las más comprometidas en la diseminación de estos microorganismos. Una de las medidas más importantes a tomar en el área de evisceración es prevenir que el paquete intestinal con su

contenido contamine los canales, para ello se debe realizar una apertura de los mismos de forma que el paquete intestinal no sufra rotura alguna.

La contaminación ulterior de las carnes en el matadero ocurre debido a la contaminación de las instalaciones y equipos durante la desolladura y la evisceración por perforación del tubo digestivo. En los establecimientos procesadores de carne la calidad higiénica de los productos se ve afectada sobre todo por la carga microbiana de la materia prima, contaminándose a partir de la misma los objetos y elementos.

Los roedores, insectos, como moscas (vectores mecánicos) y aves silvestres también pueden intervenir en la transmisión de *Salmonella*.

En cuanto al reservorio humano, el porcentaje de portadores sanos es muy bajo (inferior a 0,1%) en el caso de las infecciones alimentarias por *Salmonella*, sin embargo juega un papel importante en la transmisión (Berdreet al 1988). Es raro el estado de portador prolongado en manipuladores de alimentos después de la gastroenteritis y la cantidad de microorganismos eliminados suele ser pequeña. Por ello, parece razonable permitir a los individuos retornar al trabajo al cesar la diarrea. Sólo en el caso de individuos de alto riesgo, cuyo trabajo involucre el manejar alimentos que se consuman crudos o sin cocción posterior se requerirán tres cultivos negativos (Miller et al, 1995).

La transmisión fecal-oral de persona a persona puede ocurrir, en especial cuando existe diarrea; en cuyo caso lactantes y adultos con incontinencia fecal conllevan un riesgo mayor de transmisión que los portadores asintomáticos. Por esta razón, se han dado brotes de salmonelosis en albergues debido a la falta de atención al lavado de las manos. Esta ruta de transmisión parece que requiere la ingestión de un número significativo de microorganismos en ausencia de inmunosupresión y/o disminución de la acidez estomacal (Miller et al., 1995).

I.8.2.3. POBLACIÓN SUSCEPTIBLE

Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, resulta necesario un inóculo grande (10^{6-8} bacterias) para el desarrollo de enfermedad sintomática tras un período de incubación de 6 a 72 horas, usualmente alrededor de 12 a 36 horas. La enfermedad se produce cuando el microorganismo tiene las condiciones favorables para multiplicarse (alimento, temperatura, humedad, etc.) hasta alcanzar una concentración alta, aumentando de esta forma la posibilidad de que se produzca la infección. Por ejemplo, alimentos mal refrigerados, ya que las temperaturas mínimas de crecimiento en los alimentos varían de 6-10° C, dependiendo del alimento.

La susceptibilidad es general pero afecta más frecuentemente a niños menores de un año y ancianos. La gastroenteritis aguda es la consecuencia habitual, pero puede variar desde el estado de portador asintomático a enfermedad sistémica (Falkow y Mekalanos, 1996).

Existe un subregistro del número de casos de salmonelosis (enfermedad causada por el consumo de alimentos contaminados por *Salmonella*) notificados anualmente. Se estima que no son informados entre un 20 hasta cerca de 100% de los casos, por lo que podrían estar ocurriendo entre 0.8 y 3.7 millones de casos sólo en Estados Unidos (Miller et al., 1995).

Al estar las salmonelas no typhi ampliamente distribuidas en la naturaleza, a diferencia de *S. typhi* y *S. paratyphi*, están en íntimo contacto con los animales, por ello, en áreas geográficas específicas suele existir correlación entre los serotipos presentes en animales y la enfermedad en el hombre (Miller et al., 1995).

La proporción máxima de infecciones suele ocurrir en las épocas más calurosas, al permitir una mejor multiplicación de la bacteria en los alimentos y coincidir con frecuentes fallos en la cadena de frío (mayo a octubre).

La dosis infecciosa mínima necesaria (10^5 – 10^6), es menor (10^3) en individuos con factores de riesgo como la edad, inmunosupresión o procesos subyacentes (leucemia, linfoma, drepanocitosis), cirugía gastrointestinal, disminución de la acidez gástrica, u otras causas debilitantes incluida la desnutrición (Gray, 1995; Miller et al, 1995). En consecuencia, las tasas de ataque serán muy variables, dependiendo del inóculo, la cepa involucrada y las características particulares del huésped.

El control de brotes en hogares de convalecientes o áreas de cuidado neonatal puede ser difícil si no se cumple con el aislamiento y por la susceptibilidad aumentada de estos pacientes. A pesar del bajo riesgo de la transmisión persona a persona, los cuidadores y los manipuladores de alimentos frecuentemente son excluidos de su trabajo mientras sean portadores convalecientes de *Salmonella* (Tauxe et al., 1988).

En contraste al bajo riesgo de transmisión de salmonelas no typhi por trabajadores sanitarios y manipuladores de alimentos, la transmisión a neonatos y niños desde madres infectadas, crónicas o recientes y otros miembros de la familia es bastante alta. Los neonatos que tienen relativa aclorhidria e ingieren gran cantidad de leche materna y fórmula láctea con capacidad buffer considerable están en mayor riesgo de transmisión fecal-oral. Ya que los neonatos están a riesgo de complicaciones severas debidas a infección por *Salmonella* se debe considerar la profilaxis antibiótica. Han ocurrido brotes en guarderías (Agunod et al., 1995).

El modelo clínico de la salmonelosis puede dividirse en gastroenteritis, fiebre entérica, bacteriemia con o sin foco extraintestinal y estado de portador asintomático. Prácticamente, cualquier serotipo de *Salmonella* puede ocasionar cualquiera de estas manifestaciones en circunstancias adecuadas (por ejemplo, en un hospedador inmunocomprometido) y puede persistir después. Sin embargo es más probable que ciertos serotipos se asocien con un síndrome clínico particular: por ejemplo, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. newport* producen gastroenteritis; y *S. cholerasuis*, bacteriemia e infección focal sin antecedentes de trastorno gastrointestinal (Falkow y Mekalanos, 1996).

Lo mismo que sucede con otras enfermedades infecciosas, las personas tienen distinta sensibilidad a las infecciones por *Salmonella* aunque, en general, la morbilidad es elevada en los brotes. Pueden darse formas asintomáticas, la mayoría de las cuales ocurren en adultos sin que aparezca ningún tipo de síntomas o sólo presenten cefalea y ocasionales deposiciones sueltas. Estos casos no son diagnosticados, salvo que se busquen en el transcurso de la investigación epidemiológica de un brote colectivo, pero dada la sintomatología leve y la evolución autolimitada, la gran mayoría de los pacientes no reciben atención médica y, otra parte importante, fuera de brotes, son diagnosticados como gastroenteritis vírica.

Las formas sintomáticas están representadas principalmente por la gastroenteritis. Los mecanismos por los cuales las salmonelas no typhi causan gastroenteritis permanecen aún sin aclarar, pese al intensivo estudio de la patogénesis de las infecciones por *Salmonella*.

Aunque se han descrito enterotoxinas antigénicamente similares a la toxina del Cólera (TC) y a la toxina termolábil de la *Escherichia coli* (TL) para el género *Salmonella*, ninguna ha sido completamente purificada ni caracterizada bioquímicamente (Peterson, 1986; Aguero et al., 1991).

Debido a la presencia de múltiples plásmidos en los serotipos de *Salmonella*, no sería extraño que la TL, transportada por un plásmido, fuera ocasionalmente transferida a *Salmonella*. Sin embargo, alguna de estas cepas productoras de enterotoxinas causantes de diarrea acuosa fulminante en humanos, puedan producir esta actividad tóxica aún después de la pérdida del plásmido.

Parece más probable que la diarrea esté a menudo relacionada con la entrada de la bacteria al enterocito y/o a la inducción de la respuesta inmune en el intestino. La entrada de la *Salmonella* a las células epiteliales está asociada a una serie de alteraciones bioquímicas, como la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico y activación de la síntesis de leucotrininas a través de la fosfolipasa A2 (Galan et al., 1992; Pace et al., 1993). Estos y otros efectos de la *Salmonella* mediados a través de las células epiteliales pueden dar como resultado la diarrea.

La patología de la infección por salmonelas no typhi en humanos revela infiltración masiva de neutrófilos en la mucosa de ambos intestinos (grueso y delgado). En contraste con el infiltrado mononuclear que se ve en la fiebre tifoidea, la desgranulación y liberación de sustancias tóxicas por los neutrófilos contribuye a la inflamación y provoca daño tisular y subsecuente secreción de líquido a través de la mucosa intestinal.

La gastroenteritis por *Salmonella* es, prácticamente, indistinguible de la producida por otros patógenos, después de la ingestión de un número elevado (10^5 - 10^6) de bacterias vivas y tras un período de incubación de 6-72 horas, por lo general 12-36, aparece súbitamente el cuadro clínico, caracterizado por diarrea (en la mayoría de los casos de moderado volumen, sin sangre ni moco y, ocasionalmente, muy acuosa), náuseas, vómitos (de variable intensidad y volumen), dolor abdominal tipo cólico y febrícula (38°C). En casos graves puede aparecer fiebre alta y sangre en las heces con deshidratación. La diarrea va a veces precedida de escalofríos y cefalalgía.

Los síntomas suelen persistir durante 2-3 días, transcurridos los cuales, la enfermedad cura espontáneamente sin complicaciones, bastando sólo el tratamiento sintomático, aunque a veces se puede prolongar semanas.

Después de resolverse la gastroenteritis, la eliminación de salmonelas no typhi en las heces puede durar de 4-5 semanas, dando lugar al estado de portador. Menos del 10% de los pacientes convalecientes portan salmonelas no typhi por más de 10-12 semanas.

Las otras formas clínicas a las que puede dar lugar la infección por salmonelas no typhi se producen cuando un pequeño porcentaje de éstas atraviesa la barrera intestinal, dando lugar a bacteriemia, endocarditis, neumonía, meningitis, osteomielitis o artritis.

Por ejemplo, *S. choleraesuis* y *S. dublin* pueden producir bacteriemia sostenida con fiebre alta y más del 50% de los hemocultivos son positivos. La bacteriemia de

alto grado sugiere una infección intravascular (la *Salmonella* tiene afinidad por las paredes endoteliales de los vasos) y la infección de la aorta con la producción ocasional de fístula aorto-duodenal. A menudo estas infecciones son la consecuencia de siembras de microorganismos en placas arterioescleróticas o aneurismas.

La endocarditis puede ocurrir en menos de un 5% de los casos, de los cuales el 75% tiene enfermedad cardíaca asociada y la mortalidad puede llegar hasta el 69%. Ocasionalmente los pacientes con infecciones por salmonela no typhi pueden presentarse como una neumonía bacteriana. Muchos de estos pacientes tiene coprocultivos positivos, sugiriendo el origen de la infección en el tracto gastrointestinal con diseminación hematógica posterior.

Un 0,9% de los casos de meningitis piógena son por *Salmonella*. La mayoría de los cuales ocurren en neonatos (74% menores de 4 meses), bien por brotes en guarderías o transmitidos por las madres que hayan padecido gastroenteritis peripartum. La osteomielitis es también más frecuente en niños y su origen es hematógico. Esta asociada a hemoglobinopatías como la drepanocitosis y otras, al lupus eritematoso sistémico, neoplasias o inmunosupresión. Aproximadamente, el 60% de los individuos con *Salmonella* y osteomielitis tienen diarrea y muchos tienen coprocultivos positivos.

La artritis séptica ocurre en niños, inmunocomprometidos y drepanocíticos. Cerca de la mitad de los pacientes tienen historia de enfermedad diarreica. Aproximadamente el 2% de las infecciones gastrointestinales pueden ir seguidas por síntomas de artritis reactiva.

I.8.3. INFECCIONES POR SALMONELAS NO TYPHI EN ESPAÑA

Al estudiar las infecciones por *Salmonella* no *typhi* en los últimos quince años (1983-1997), debemos comenzar por señalar que la información disponible proviene del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda, al cual se envían cepas de *Salmonella* desde diferentes puntos de la geografía española, existiendo una progresiva participación de cada una de las provincias, incluyendo la de Santa Cruz de Tenerife, y un consecuente aumento del número de cepas recibidas para serotipificación cada año (Echeita y Usera, 1989; Usera et al., 1995).

Las cepas aisladas provienen tanto de muestras de origen humano como de origen no humano, que incluye alimentos para el consumo humano o animal (piensos y materias primas), muestras ambientales y muestras de animales enfermos o portadores. En este punto es importante destacar el creciente número de laboratorios dedicados a estudiar muestras de origen distinto al humano, lo que ha supuesto un aumento importante del total de las cepas de origen no humano año tras año respecto a los primeros cuatro años del período analizado, especialmente a partir de 1987. Esta circunstancia supone un avance en el conocimiento de la distribución de *Salmonella* aislada de dichos orígenes (Echeita y Usera, 1989; Usera et al., 1995).

Respecto a las muestras de origen alimentario señalar que entre 1983-1987 sus principales fuentes fueron la carne de aves (30,5%) y los huevos (16,8%). (Boletín Epidemiológico Semanal (BES) nº 1694/1985; BES nº 1752/1986; BES nº 1753/1986; Echeita y Usera, 1989). En los siguientes cinco años, de 1988 a 1992 estos representan el 22,6% y 7,9%, respectivamente, de las muestras de origen alimentario, cuyo porcentaje en relación al total de cepas estudiadas es del 15,8% (BES 1993/Vol1/nº8; Usera et al., 1995). En el período 1993-1996 el porcentaje de muestras de origen alimentario estudiadas respecto al total correspondió también a un 15%, pero el porcentaje de cepas procedentes de huevos se encuentra entre 3,5 y 7,8% y el de carne de aves entre 12,2 y 23,5% (BES 1994/Vol2/nº9; BES 1995/Vol3/nº15; BES 1996/Vol4/nº15; BES 1996/Vol5/nº8; BES 1997/Vol5/nº3).

Durante todo el período, tanto en las muestras de origen humano como en las de diferente origen, los tres serotipos más frecuentes fueron: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, y *S. virchow*, pero con diferencias en el porcentaje y en la tendencia de cada serotipo en los diferentes años. Así puede señalarse que en los primeros cinco años (1983-1987) *S. enteritidis* ocupó el primer lugar de frecuencia con tendencia al aumento desde un 43,5% a un 68,7%, comenzando a disminuir a partir de 1988 hasta representar el 43,6% en 1996, pasando por un 40,7% en 1994; pero a pesar de esta disminución *S. enteritidis* prevalece como el serotipo más frecuente en España, siendo superada por *S. typhimurium* sólo en los años 1994 y 1995 en muestras de origen no humano y por estrecho margen de ventaja (Tabla 4 y Gráfico 1).

Por su parte *S. typhimurium* ha sido consistentemente el segundo serotipo más frecuente, observándose en los primeros cinco años una tendencia a la disminución desde un 21,5% a un 8,3% y una tendencia inversa a partir de 1988 aumentando desde 13,5% hasta 31,6% en 1996.

S. virchow aumenta desde 0,5% hasta 8,1% durante los años comprendidos entre 1983-1992, manteniéndose con oscilaciones y con una tendencia a la disminución de su frecuencia en el resto del período.

Otros serotipos dignos de mención son *S. ohio*, *S. infantis*, *S. hadar* y *S. bredeney*. Los dos primeros importantes por su frecuencia en los años 1983-1987, cuando ocuparon el cuarto y quinto lugar de frecuencia, los dos últimos por ocupar, respectivamente, los mismos lugares de frecuencia en el período comprendido entre 1988-1993.

Es especialmente significativo el incremento experimentado por *S. hadar* a partir de 1987, muy llamativo en 1996, cuando se identifican 285 cepas de origen humano, lo que supone un incremento del 25,5% sobre la cifra obtenida el año anterior, convirtiéndose en el tercer serotipo más frecuente de *Salmonella* aislado en España, desplazando a *S. virchow* en el mismo año. Se ha observado un comportamiento similar de *S. hadar* en Francia y en el conjunto de Europa, donde en

estos momentos ha pasado a ser el tercer serotipo aislado con mayor frecuencia (BES 1996/Vol4/nº43; Bouvet y Grimont, 1996).

Destaca la aparición de *S. bradenburg* dentro del listado de los cinco serotipos más frecuentes en muestras humanas, desplazando a *S. bredeney* a partir de 1994 (BES 1996/Vol4/nº43).

En 1997, en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* se estudiaron 4988 cepas de origen humano y 1050 de origen no humano (alimentos, ambiente y animal enfermo). En ambos grupos continua incrementándose el número de muestras estudiadas en relación al año anterior.

En relación a las cepas de origen humano procedentes de casos esporádicos los serotipos más importantes en orden de frecuencia fueron *S. enteritidis* (41,9%), *S. typhimurium* (33,7%) y *S. hadar* (6,8%), apreciándose una ligera disminución de la incidencia de *S. enteritidis* y *S. hadar* respecto a 1996, mientras que el serotipo Typhimurium aumentó. Llama la atención el aumento importante de la incidencia de *S. bovismorbificans* que pasa del 0,4% en 1996 al 0,9% en 1997 y la disminución del serotipo Virchow que además de bajar a ocupar el 5º puesto , disminuye del 3,1% al 1,6%.

Respecto a los brotes estudiados en 1997, *S. enteritidis* sigue siendo, como en años anteriores el principal responsable, tanto en brotes comunitarios como familiares, seguido en ambos casos por el serotipo Typhimurium. El alimento más involucrado es el huevo y sus derivados, otros alimentos fueron: helados, ensaladas, carne de pollo, pasteles y pescado (BES 1998/Vol6/nº 13).

El análisis de las cepas de *Salmonella* de origen no humano (alimentos, ambiente y animales enfermos) en España durante el año 1997 revela que el mayor número de cepas se aisló en muestras de carne de pollo, seguido por otras carnes, embutidos y carnes procesadas. Las cepas aisladas de alimentos hechos con huevo y las de pienso han disminuido respecto al año anterior.

Los tres serotipos más frecuentes son Enteritidis, Typhimurium y Hadar, al igual que las cepas de origen humano, sin embargo el porcentaje de los mismos es inferior en el grupo de los alimentos, siendo especialmente acusada esta disminución en el serotipo Typhimurium. El serotipo Enteritidis, al igual que en años anteriores, está especialmente relacionado con carne de pollo y con alimentos hechos con huevo. El serotipo Hadar está relacionado con carne de pollo de donde parece haber desplazado al serotipo Virchow que disminuye considerablemente, llegando incluso a no estar incluido en el grupo de los diez más frecuentes.

Los serotipos Anatum y Heidelberg son, claramente, más abundantes en los alimentos que en el ambiente y en los animales. El serotipo Brandenburg que ocupa el cuarto lugar en muestras de origen humano, también es frecuente en alimentos, sobre todo en carnes procesadas y embutidos y carne de pollo, como también lo son *S. anatum* y *S. typhimurium* (BES 1998/Vol 6/nº 14).

Tabla 4. N° (%) de aislamientos de los principales serotipos de *Salmonella* en España entre 1983-1996

A. Origen humano

Año	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. ohio</i>	<i>S. infantis</i>
83	1021 (43,5%)	504 (21,5%)	12 (0,5%)	127 (5,4%)	94 (4,0%)
84	1382 (54,2%)	348 (13,6%)	81 (3,2%)	78 (3,0%)	105 (4,1%)
85	2016 (64,5%)	357 (11,4%)	99 (3,1%)	72 (2,3%)	52 (1,7%)
86	2571 (67,8%)	344 (9,1%)	159 (4,2%)	65 (1,7%)	49 (1,3%)
87	2976 (68,8%)	363 (8,4%)	278 (6,4%)	61 (1,4%)	39 (0,9%)
83-87	9966 (61,8%)	1916 (11,9%)	629 (3,9%)	403 (2,5%)	339 (2,1%)
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. hadar</i>	<i>S. bredeney</i>
88	1500 (57,6%)	353 (13,6%)	225 (8,6%)	16 (0,6%)	49 (1,9%)
89	1720 (459 (16,2%)	192 (6,8%)	26 (0,9%)	47 (1,6%)

	60,6%)				
90	1692 (55,4%)	552 (18,1%)	177 (5,8%)	24 (0,8%)	58 (1,9%)
91	1755 (51,9%)	799 (23,6%)	223 (6,6%)	96 (2,8%)	31 (0,9%)
92	1720 (50,4%)	835 (22,5%)	270 (7,9%)	83 (2,4%)	38 (1,1%)
93	1517 (51,2%)	815 (27,5%)	181 (6,1%)	80 (2,7%)	28 (0,9%)
88-93	9904 (54,3%)	3813 (20,9%)	1268 (6,9%)	325 (1,7%)	251 (1,3%)
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. hadar</i>	<i>S. bradenburg</i>
94	1355 (40,8%)	930 (27,9%)	386 (11,6%)	131 (3,9%)	41 (1,2%)
95	1618 (41,9%)	1155 (29,9%)	194 (5,0%)	179 (4,6%)	71 (1,8%)
96	2032 (43,6%)	1381 (29,6%)	145 (3,1%)	334 (7,2%)	74 (1,6%)
94-95	5005 (42,3%)	3466 (29,3%)	725 (6,1%)	644 (5,4%)	186 (1,6%)

B. Origen no humano

Año	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. infantis</i>	<i>S. vrchow</i>	<i>S. ohio</i>
83	24 (13,9%)	22 (12,8%)	8 (4,7%)	0 (0%)	15 (8,7%)
84	21 (25,0%)	7 (8,3%)	6 (7,1%)	1 (1,1%)	2 (2,3%)
85	71 (41,8%)	30 (17,6%)	9 (5,3%)	1 (0,6%)	8 (4,7)
86	171 (43,2%)	31 (7,8%)	20 (5,0%)	34 (8,6%)	8 (2,0%)
87	185 (28,2%)	53 (8,0%)	9 (1,4%)	68 (10,4%)	29 (4,4%)
83-87	472 (31,9%)	143 (9,7%)	114 (7,7%)	104 (7,0%)	62 (4,2%)
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. anatum</i>	<i>S.4,12:b:- (II)</i>
88	232 (57,6%)	88 (21,8%)	46 (11,4%)	12 (2,9%)	21 (5,2%)
89	197 (33,1%)	102 (17,1%)	75 (12,6%)	19 (3,2%)	28 (4,7%)
90	252 (46,7%)	132 (24,4%)	43 (7,9%)	30 (5,6%)	18 (3,3%)
91	188 (35,1%)	128 (23,9%)	28 (5,2%)	34 (6,3%)	33 (0,8%)
92	292 (46,6)	148 (23,6%)	101 (16,1%)	31 (4,9%)	26 (4,2%)
88-92	1161 (43,0%)	598 (22,1%)	293 (10,8%)	126 (4,7%)	126 (4,7%)
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. derby</i>	<i>S. bredeney</i>

93	628 (30,4%)	240 (11,6%)	98 (4,8%)	81 (3,9%)	72 (3,4%)
	<i>S typhimurim</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. hadar</i>	<i>S. infantis</i>
94	230 (17,7%)	228 (17,6%)	82 (6,3%)	36 (2,8%)	35 (2,7%)
95	283 (17,4%)	277 (17,0%)	75 (4,6%)	71 (4,4%)	45 (2,8%)
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. hadar</i>	<i>S. virchow</i>	<i>S. derby</i>
96	183 (20,8%)	137 (15,6%)	66 (4,0%)	39 (2,4%)	33 (2,0%)

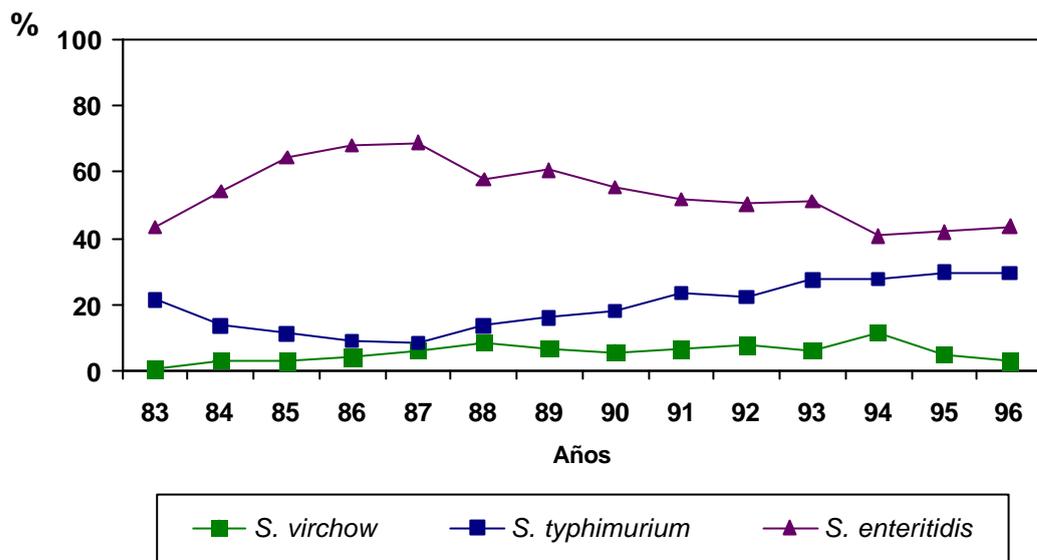
En el año 1985, el Laboratorio de Enterobacterias del CNMVIS realizó por primera vez la fagotipia de todas las cepas de *S. typhimurium* recibidas, utilizando el juego internacional de bacteriófagos suministrados por el Central Public Health Laboratory, Colindale de Londres.

En muestras de todos los orígenes se encontraron los fagotipos (FT) 96 y el 104 con mayor frecuencia, seguidos del 66 (BES n° 1753/1986). En cuanto a las muestras de origen humano los fagotipo de *S. typhimurium* más frecuentes en España fueron el 66, 96 y 104, para el año 1985 y para muestras no humanas los fagotipos 96 y 104 (BES n°32/1986). Para esta fecha, en España no se realizaba aún el fagotipado de otros serotipos de *Salmonella*.

Para 1994 (BES 1996/Vol4/n°2), el FT 104 fue más frecuente (28,5%), pero con tendencia a la disminución a partir de 1992; le siguen los no tipables (21,9%) y el FT 193 (20,3%).

En 1995 en primer lugar de frecuencia (aunque disminuye) se encuentra el fagotipo 104 (22,9%), seguido de los no tipables (25,4%), FT 193 (15,8%) y el FT 120 que aumenta de 2,2 hasta 12,40% (BES 1996/Vol4/n°18).

Gráfico 1. Evolución de los serotipos de *Salmonella* aislados con mayor frecuencia en muestras de origen humano en España (1983-1996).



Para 1996 tenemos que en muestras de origen humano los fagotipos más frecuentes para *S. typhimurium* fueron, en orden de frecuencia, el 104 (20%), 193 (13,7%) y el 120 (11%); para *S. enteritidis* los fagotipos 4, 6 y 1, con 45,7%, 19% y 12,1% respectivamente; y para *S. virchow* se describen los fagotipos 8 (44,4%) y 31 (19,4%).

Este mismo año se dispone ya de información sobre los fagotipos de *S. typhimurium* más importantes en muestras de alimentos (104, 193 y 110), coincidiendo estos fagotipos con los de mayor frecuencia en muestras de origen humano (BES 1997/Vol5/n8).

En 1997 el fagotipo 4 de *S. enteritidis* sigue siendo el serotipo más frecuente, aunque disminuye, el fagotipo 1 aumenta de manera importante, pasando de 12,1% en 1996 a 24,2% en 1997, mientras que el fagotipo 6a ocupa el tercer lugar.

Para el serotipo Typhimurium, preocupa el aumento del número de cepas no tipables, no obstante los tres más importantes siguen siendo el FT 104, FT 120 y FT 193. Los fagotipos 104b y 204 aumentan respecto al año anterior y el 195 disminuye.

Para *S. virchow* son el FT 8, FT 31 y FT 19, similar a los resultados de 1996 cuando se inicio la tipificación de este serotipo.

I.8.4. ALIMENTOS IMPLICADOS EN BROTES DE SALMONELOSIS EN ESPAÑA

La salmonelosis constituye un importante problema de Salud Pública en España, siendo la causa del 50% de los brotes de origen alimentario. Es ampliamente conocido que los productos elaborados con huevo son los principales alimentos implicados en los brotes de salmonelosis, y sobre estos recaen medidas de control de diversa índole, tanto a nivel nacional como en el resto de los países europeos o en los Estados Unidos. Así por ejemplo, en España, el Real Decreto 1254/1991 establece las normas para la preparación y conservación de la mayonesa y otros alimentos de consumo inmediato en restauración en los que el huevo es un ingrediente.

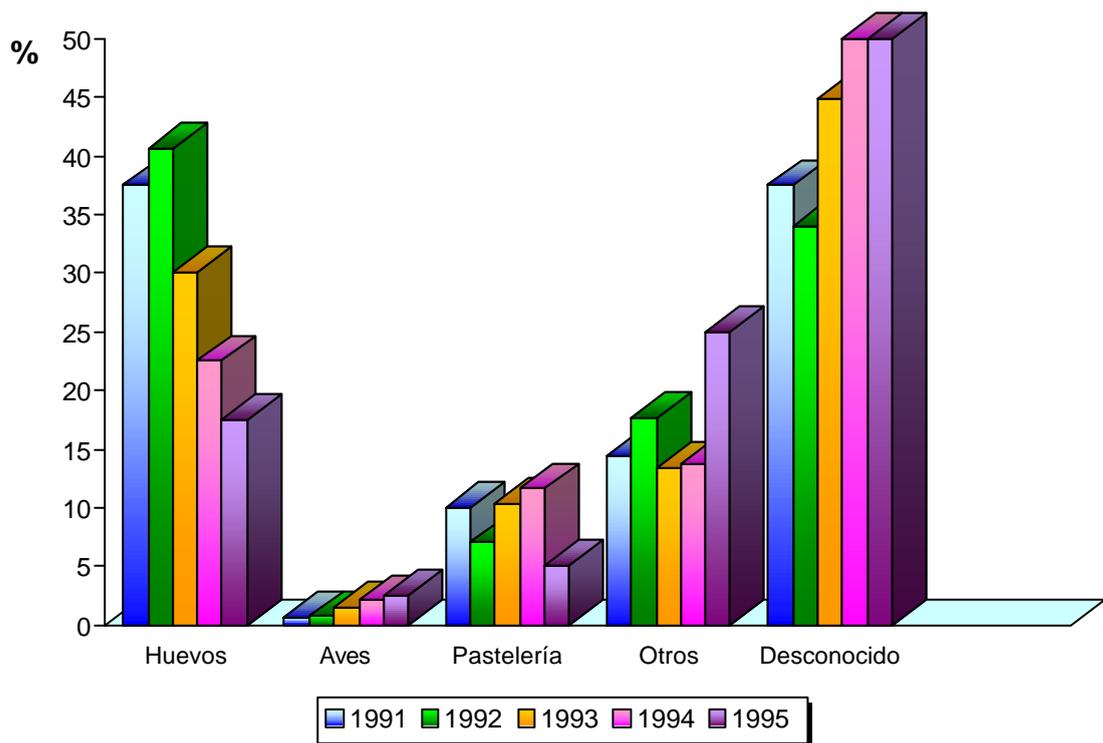
La vigilancia epidemiológica nos permite conocer el comportamiento de la *Salmonella* y poder establecer oportunas medidas preventivas, que tienen como objetivo identificar el alimento causante de la infección y evitar la diseminación, establecer normas de preparación, manipulación y conservación de los alimentos potencialmente infectantes o incluso detectar granjas infectadas.

En España, un estudio descriptivo de la evolución de los alimentos implicados en brotes de *Salmonella*, a partir de las cepas enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella*, durante el período 1991-1995, señala que el número total de brotes causados por *Salmonella* declarados a lo largo de dicho período es de 172, 152, 114, 93 y 80 respectivamente para cada año.

Los alimentos mayormente implicados en los brotes son el huevo y sus derivados, los productos de pastelería y la carne de aves, como puede verse en el Gráfico 2. El resto de los alimentos implicados: mariscos, lácteos, productos cárnicos y hamburguesas, representan frecuencias relativas menores sobre el total.

Existe una importante variación a lo largo de los años de estudio en los alimentos que contienen huevos y las aves. Los primeros están implicados desde 37,5% a 17,5%, lo que corresponde una disminución constante y significativa; mientras que las aves sufren un aumento también constante y significativo, estando implicadas desde un 0,6% a 2,5% sobre el total de brotes durante estos años. Esta disminución de los alimentos que contienen huevo como agentes implicados en brotes parece estar en consonancia con la efectividad de las medidas de control establecidas respecto a dicho alimento (BES 1996/Vol4/nº17).

Gráfico 2. Alimentos implicados en brotes en España (1991-1995)



I.8.5. TRANSMISIÓN EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE POLLOS

La contaminación por *Salmonella* puede ser introducida a los pollos en distintos puntos a lo largo de la cadena de producción que incluyen el período de crecimiento, el transporte, matanza, procesado, pesado, envasado y venta (White et al., 1997; Hogue et al., 1998). Las consecuencias de esta bacteria en los pollos son enfermedad humana, muertes y costes asociados a la industria y al consumidor (Bryan y Doyle, 1995).

El producto final contaminado con microorganismos patógenos como *Salmonella* es el reflejo de la contaminación de las aves vivas y, por ello, las medidas a ser tomadas en la industria para evitar la contaminación del producto apto para consumir deberá iniciarse en las aves vivas. Muchos factores influyen en la contaminación de aves vivas y procesadas. La transferencia de microorganismos a los canales refleja el cuidado tomado en la planta de matanza y la carga microbiana adquirida por las aves durante el período de crianza o durante el transporte a las plantas procesadoras (Mulder, 1997).

La cadena de producción avícola comienza con un pequeño número de aves seleccionadas por sus características comerciales como conversión alimentaria o conformación corporal y termina con una gran cantidad de aves en el nivel de producción. En la medida que la pirámide de reproducción desciende, hay un aumento gradual en la densidad de almacenaje, hasta 100.000 aves por área, que a pesar de ser favorable para el desarrollo del ave, también introduce la posibilidad de aumentar la diseminación de microorganismos y de introducir enfermedades (Mulder, 1997).

Podemos dividir la cadena de producción en dos sectores, uno el de las ponedoras destinadas a la producción de huevos para el consumo humano y otro el de las reproductoras, que atiende la demanda de huevos para la producción de los polluelos que irán a las granjas de crianza, donde estarán entre seis y siete semanas, antes del sacrificio (Balta i Moner, 1996).

Se ha planteado que la *Salmonella* llega a las aves ponedoras y reproductoras a través de los alimentos (piensos) y el medio contaminados (bebederos, agua, dispensadores de alimentos y jaulas) de esta manera la *Salmonella* alcanza el tracto digestivo de las aves (Lahellec et al., 1986). El mecanismo mediante el cual *Salmonella* coloniza las aves no es totalmente conocido; sin embargo, se sabe que el ciego es el principal sitio de colonización. Varios estudios han demostrado la excreción y disminución progresiva de la eliminación de *Salmonella* a medida que el pollo aumenta de edad (Morris et al., 1969; Jones et al., 1991). Los pollos pueden excretar tanto como 10^8 *Salmonellae* por gramo de heces, pero a medida que madura y a pesar de que la *Salmonella* se encuentre presente en el medio o en el alimento, el número de bacterias excretadas tiende a disminuir al igual que el porcentaje de aves infectadas (ICMSF, 1980).

La transmisión vertical es posible desde las reproductoras pero probablemente sea menos importante con cepas no invasivas. Sin embargo, el patrón epidemiológico de *S. enteritidis* fagotipo 4 es completamente diferente, además de ser un patógeno humano frecuente, este organismo es virulento en los pollos jóvenes, siendo capaz de transmitirse verticalmente y producir alta mortalidad (Humphrey, 1989).

Se ha comprobado el desarrollo de septicemia e infección ovárica tras la infección experimental de gallinas con *S. enteritidis* (Timoney et al., 1989; Gast, 1993). Esto puede llevar a una alta tasa de infección interna de los huevos, pudiéndose aislar, consecuentemente, el microorganismo de la yema y órganos internos de los pollos incubados a partir de dichos huevos infectados (Mc Ilroy et al., 1989; O'Brien, 1990; Yang, 1992).

Padrón (1990) ha demostrado la posibilidad de que se produzca invasión a través de la cáscara desde el aparato reproductor de la gallina, obteniéndose un huevo intacto contaminado (transmisión vertical) tanto en su cáscara, como en la yema y clara. Lo que puede ocurrir en gallinas infectadas por *S. enteritidis* de manera artificial (inoculadas oralmente y expuestas a contacto horizontal) o de manera natural. En el caso de las gallinas infectadas de forma natural se obtienen huevos

contaminados en menor frecuencia y con menor número de microorganismos (Gast y Beard, 1993). Además de la vía de los ovarios y oviductos el huevo, específicamente su cáscara, puede adquirir la *Salmonella* por contaminación fecal, pudiendo penetrar las capas y membranas durante el período de enfriamiento tras la puesta, infectándose los pollos a partir de la cáscara durante o después de la incubación (Williams et al., 1968; ICMSF, 1980).

Además de *S. enteritidis*, también se ha podido aislar *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* y *S. heidelberg* de ovarios de aves infectadas de forma natural (Snoeyenbos et al., 1969; O'Brien, 1988) y se ha sugerido que la infección transovárica podría ser el mecanismo de contaminación del huevo en brotes por salmonelosis (St. Louis et al., 1988). La infección de las ponedoras no parece disminuir la fertilidad de forma importante (Hopper y Mawer, 1988; Lister, 1988).

El grado de contaminación de los huevos puede verse incrementado si éste no es almacenado en condiciones favorables, ya que el cambio en la permeabilidad de la membrana vitelina es dependiente de la temperatura y favorecerá la invasión de *Salmonella* a la yema del huevo (Humphrey, 1989).

La obtención de un huevo contaminado se ha comprobado, como se ha dicho con anterioridad, puede dar origen de la infección sistémica de los pollos, con la consiguiente infección de órganos internos de los mismos y simultáneamente se puede estar produciendo la transmisión horizontal de la *Salmonella*, a través de la contaminación de incubadoras, jaulas, personal y equipos; contribuyendo además en la transmisión la pobre desinfección del medio y la presencia de roedores infectados (Baskerville et al., 1992; Holt, 1993; Gast, 1994; Van Gessen et al., 1994; Gast, 1994; Gast y Benson, 1996).

Un pequeño porcentaje de los pollos puede fallecer, los que sobreviven llegan a las granjas donde la crianza intensiva y el hacinamiento favorecerán la transmisión a través de la contaminación cruzada, infectándose los pollos sanos de corta edad. En estos pollos la infección aguda puede durar entre 1 y 2 semanas, manteniendo luego una excreción intermitente de *Salmonella* durante las semanas restantes que deberán

permanecer hasta alcanzar seis a siete semanas de edad. Actualmente, existe una tendencia a sacrificarlos a menor edad, al alcanzar el peso adecuado para ser transportados hacia los mataderos (Mulder, 1997; Balta i Moner, 1996).

El proceso de carga y transporte hacia los mataderos provoca estrés en las aves lo que se ha relacionado con los mecanismos de contaminación endógena de las mismas. Incluso bajo condiciones normales de transporte, puede producirse una tasa de contaminación cercana al 50%, sufriendo el 10% de las aves transportadas una bacteriemia inducida por estrés, aumentando el riesgo para el consumidor de carne de pollo. Sin embargo, aún es necesario ampliar las investigaciones para caracterizar este proceso de contaminación endógena (Van Gessen et al, 1994; Mengert y Fehlhaber, 1996).

Por lo tanto, es recomendable el reposo previo al sacrificio, ya que este tiempo reducirá la frecuencia de contaminación (Mengert y Fehlhaber, 1996). El estado de fatiga o excitación de los animales agotan el glucógeno muscular y facilitan la permeabilidad microbiana del intestino por disminución de los mecanismos inmunitarios, que también facilitan la invasión microbiana en la fase agónica e incluso después de la matanza, ya que dichos mecanismos pueden persistir después de la muerte. Igualmente, se recomienda el ayuno, a objeto de disminuir la carga microbiana intestinal y sus posibles riesgos (Pozo Lora, 1984).

Con lo cual, al matadero llega un porcentaje de la materia prima con carga microbiana. Durante el sacrificio y agonía, los microorganismos transponen la barrera intestinal, utilizando diversas vías de penetración, bien sean las vías naturales de los vasos sanguíneos y linfáticos, o bien los propios intersticios del tejido conectivo muscular (Pozo Lora, 1984).

Después del sacrificio, el mecanismo de contaminación involucra la retención de bacterias en una fina capa de líquido sobre la piel del animal, desde la que migran hacia zonas más profundas de la misma a través de pliegues y grietas (Lillard, 1989; Thomas y McMeekin, 1980; Thomas y McMeekin, 1982; Thomas et al., 1987). Sin embargo, el proceso de retención comienza en las aves vivas, ya que la flora

microbiana refleja aquella liberada del tracto intestinal y la cargada en las plumas y en las patas.

Durante el escaldado con agua caliente, donde se suele intensificar la retención, puede ocurrir que:

- La *Salmonella* sea eliminada por las altas temperaturas
- Que floten y se dispersen en el agua
- Que sobrevivan y se redistribuyan en el mismo u otros canales (Bryan y Doyle, 1995).

Existen dos tipos de escaldado, uno suave a 50-52° C y uno fuerte a 58°C ó más. El primero se usa, principalmente, en el caso de pollos frescos y el segundo para los pollos que se congelarán, los cuales representan el mayor riesgo potencial (Humphrey, 1989).

El escaldado suele conllevar a la contaminación tanto de la superficie de los canales como de tejidos profundos (Mulder et al., 1976; Mulder et al., 1978; Lilliar et al., 1987). Es ineficaz en la remoción total o eliminación de los microorganismos fijados a la piel del pollo (Notermans y Kampelmacher, 1975) y los que sobreviven al escaldado son difíciles de remover en estadíos posteriores del procesamiento (Notermans y Kampelmacher, 1975; Humphrey, 1989).

La retención continúa y el nivel de contaminación se relaciona con la concentración microbiana en las aguas de procesado (McMeekin y Thomas, 1978). El escaldado abre los folículos de la pluma para facilitar la remoción de la misma, éstos permanecen abiertos a lo largo del procesamiento hasta el momento del enfriamiento del canal, cuando se cierran reteniendo dentro los microorganismos. Allí se resisten a ser removidas por las subsecuentes operaciones de lavado, aislándose con más frecuencia *Salmonella* en esta fase, así como otros microorganismos aerobios y *Staphylococcus*, relacionados con la difusión de

bacterias en las maquinas desplumadoras y su inadecuada limpieza (Notermans y Kampelmacher, 1975; Bryan y Doyle, 1995).

Por otra parte, esta operación genera aerosoles, y los microorganismos pueden alcanzar otros canales, equipos, trabajadores y otras superficies ambientales. Es frecuente aislar *Salmonella* de los dedos de los guantes de goma usados para quitar las plumas (Kotula y Kinner, 1964; Patterson, 1973; Oosterom, 1985).

Se ha comprobado tras visualización mediante microscopio electrónico que, después de la eliminación de las plumas previo sometimiento a inmersión en agua caliente, la epidermis es removida, y el tejido dérmico queda expuesto, produciéndose contaminación por microorganismos presentes en el equipo de desplumar (complicado de limpiar y descontaminar). En subsecuentes estadíos del proceso, tales como el lavado por inmersión y el enfriamiento de los canales en tanque, se facilita la diseminación de *Salmonella* de un canal a otro (Thomas y Mc Meekin, 1980; James et al., 1992; Lahellec y Colin, 1984; Mulder, 1997).

Más adelante, microorganismos como *Salmonella* se adhieren al material polisacárido y al material que rodea las fibras de colágeno (Firstenberg, 1981; Thomas y McMeekin, 1981; Thomas et al., 1987). La adherencia es rápida, aproximadamente de 15 segundos de exposición, pero el ataque es un proceso dependiente del tiempo (Lillard, 1985). Aparentemente, la bacteria es transferida desde la capa de agua sobre la superficie a la piel en la medida que aumente el tiempo de inmersión (Lillard, 1986).

Inicialmente, durante la fase logarítmica de crecimiento, las bacterias están confinadas a la superficie de la carne. La carne sufre modificaciones desde el momento en que se sacrifica el animal; estos cambios son debidos a enzimas tisulares, enzimas microbianos y a la oxidación de los lípidos. Estos cambios degradativos, autolíticos, rompen el tejido conectivo entre las fibras musculares y convierten a la carne en un substrato favorable para el crecimiento microbiano trayendo como consecuencia la penetración de la bacteria en la carne (Gill y Penney, 1977; Pozo Lora, 1984).

Durante la evisceración, continua la transferencia de microorganismos desde los canales a las manos de los trabajadores y al equipo, utensilios y superficies que tengan contacto con los canales. El corte del tracto intestinal o la manipulación violenta durante la extracción de las vísceras tanto por parte de los trabajadores como por equipo mecánico contribuye a la diseminación de material fecal, contaminándose los siguientes canales. Usando un marcador bacteriano, se demostró que los siguientes 42 canales se contaminaban y que hasta el número 150, pueden aparecer algunos canales esporádicamente contaminados (Stewart, 1965).

La remoción de las vísceras, por lo general, se lleva a cabo de forma automática. El equipo es calibrado para aves de un tamaño y peso particular. Las variaciones naturales que puedan presentarse traen como consecuencia la ruptura del paquete intestinal y la contaminación de los canales y del equipo con el contenido intestinal, con la consecuente contaminación de los siguientes canales (Humphrey, 1989).

Los canales de pollo son enfriados bien por inmersión en agua fría o por ráfagas de aire frío; el primer caso se usa principalmente en el caso de pollos que serán congelados y el segundo para pollos frescos.

Los equipos usados para pesar, cortar y separar en piezas, empaquetar y conservar, entre otros, juegan un papel importante en la contaminación cruzada. Se contaminan con *Salmonella* a partir de los canales y las partes del producto final se contamina en mayor proporción que los canales de los que fueron obtenidos (Bryan et al., 1968).

Finalmente, el producto contaminado llega a los puntos de venta y de allí a restaurantes, hoteles, instituciones, hogares, etc., hasta alcanzar el individuo susceptible.

El agua de descongelación del producto congelado es una fuente importante de *Salmonella* y tiene importancia en la contaminación cruzada que se produce en las superficies de cocina. Es importante una completa descongelación del producto antes

de cocinarlo, ya que esto reduce la posibilidad de que el ave sea cocida insuficientemente.

Si no se prepara adecuadamente y no se toman las medidas higiénicas necesarias para su manipulación puede resultar en infección alimentaria, bien por su propio consumo o por contaminación cruzada de otros alimentos.

En resumen, la contaminación por *Salmonella* de los pollos ocurre antes de entrar a la planta procesadora, a partir de una diversidad de fuentes en las granjas, introduciendo estos patógenos en la planta y diseminándose por contaminación cruzada en el medio de procesamiento.

Aún en plantas dotadas de modernos mecanismos sanitarios la *Salmonella* sigue estando presente a través de las diferentes operaciones de procesamiento. El escaldado, la extracción de la plumas, la evisceración y la separación en menudillos son los puntos de mayor transferencia de microorganismos.

A menudo es mayor el número de canales y porciones procesadas contaminadas que el número de animales vivos infectados o contaminados que llegaron a la planta para su sacrificio.

I.8.6. SITUACIÓN INTERNACIONAL DE LAS SALMONELAS NO TYPHI

La incidencia *Salmonella typhi* ha bajado significativamente a nivel mundial, en especial en países desarrollados, debido a la improvisación de la higiene de los alimentos y el tratamiento del agua. A diferencia de esto, la incidencia de infecciones por salmonelas no typhi ha aumentado dramáticamente a partir de la década de los ochenta (Miller et al., 1995).

De esta manera, sólo en Estados Unidos se estima que se producen entre 2-4 millones de casos de salmonelosis cada año y al menos 500 defunciones (Ravenholt et al., 1996). Aproximadamente, 40.000 de estas infecciones se confirman mediante cultivos microbiológicos. Las cepas son serotipadas y notificadas por el Center for Diseases Control (CDC) a través del Sistema Nacional de Vigilancia de *Salmonella*.

En 1991, *S. typhimurium* fue el serotipo más frecuentemente aislado, a pesar del aumento de los aislamientos de *S. enteritidis* que para 1995 ya ocupa el primer lugar de frecuencia, respondiendo por el 25% de los 40.720 casos confirmados por cultivo y serotipificación

Se han descrito brotes epidémicos por diferentes serotipos relacionados con diversas fuentes, por ejemplo, brote por *S. enteritidis* relacionados con huevos en el noreste de Estados Unido; *S. hadar* relacionados con patitos mascotas en Connecticut, Maryland y Pensilvania (Editorial JAMA, 1992); *S. arizonae* relacionado con la ingestión de carne de serpiente vendida como medicina folklórica; *S. munchen* con Marihuana contaminada; *S. dublin* con leche no pasteurizada e inyección de hígado de res como tratamiento alternativo de enfermedades malignas; *S. poona* con melones y *S. javiana* con tomates (Miller et al., 1995).

El mayor brote de salmonelosis en Estados Unidos ocurrió en Chicago en 1984. Aproximadamente 200.000 individuos adquirieron *S. typhimurium* a través de leche pasteurizada contaminada. El brote fue causado por un organismo con un plásmido con inusual patrón de resistencia. Aunque la causa real de la contaminación

no pudo ser demostrada, se cree que se debió a la contaminación de la leche después de pasteurizada con leche no pasteurizada (Miller et al., 1995).

En los países desarrollados la salmonelosis está relacionada con el consumo de aves de corral y huevos. Los huevos insuficientemente cocidos son una fuente común de *S. enteritidis*. Brotes por el fagotipo 4 de *S. enteritidis* en Estados Unidos y Reino Unido han sido debidos a la ingestión de huevos contaminados.

Durante 1988-1992, en los brotes de salmonelosis transmitida por alimentos notificados por el CDC, de los que se conoció el alimento implicado, el consumo de pavos y huevos representaron el 4% y 14% de los casos, respectivamente. Además, los huevos y alimentos con huevos como ingrediente principal fueron la causa del 64% de los brotes por *S. enteritidis*. Estos brotes relacionados con huevos están ligados a los fagotipos 8 (68%) y 13a (20%) de *S. enteritidis* (Hickman-Brenner et al., 1991), asociándose el fagotipo 8 en un 58% con aves de corral y 24% con otros animales. En cuanto a los aislamientos en muestras humanas de casos esporádicos encontramos en orden de los fagotipos 8 (48%), 13a (37%), 14b (8%), 9^a (3%) y 13 (2%), con distribución semejante en aislamientos producto de brotes (Rodrigue et al, 1992).

El número de casos de salmonelosis en los Estados Unidos ha mostrado un constante aumento a partir de 1960. Aunque parte de este aumento puede atribuirse al avance de las técnicas de detección y notificación; sin embargo, ésta tendencia ilustra bien la importancia que la *Salmonella* sigue teniendo como problema de salud pública (Wagner y McLaughlin, 1986). En el año 1985, existe un incremento en el número de casos, debido a la ocurrencia de un brote por *S. typhimurium* en Illinois. Posteriormente, la tendencia es a la disminución del número de casos, con seguridad debido a las medidas sanitarias adoptadas. A partir de 1995, *S. typhimurium* es el serotipo más frecuente y el responsable del mayor número de brotes tanto en Estados Unidos como en Canadá (Todd, 1990). No obstante en New England y los estados americanos del noreste, *S. enteritidis*, continua siendo un serotipo importante dado el aumento en el número de casos.

Los serotipos de *Salmonella* spp., que con mayor frecuencia causan enfermedad humana transmitida a través de los pollos incluyen, en orden descendente a: *S. heidelberg*, *S. hadar*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. berta*. Estos serotipos representan más del 50% de los aislamientos en pollos. Mientras que los serotipos identificados con más frecuencia de fuente humana en los Estados Unidos fueron, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg* y *S. newport*. Estos serotipos representan aproximadamente el 65% de los serotipos conocidos.

S. newport es el serotipo aislado en menor frecuencia, asociándose con enfermedad humana sólo en un 4-6% de los casos en Estados Unidos. Sin embargo, este serotipo juega un papel importante en el Estado de Arkansas, como causante de enfermedad. No es un serotipo asociado con frecuencia a las aves, derivados de aves o plantas de procesamiento de aves, sino más bien al ganado y al sedimento del agua fresca.

Aunque *S. typhimurium* puede ser encontrada en pollos y *S. heidelberg* es el serotipo asociado a pollos que más frecuentemente afecta a los humanos, sin embargo, la prevalencia de enfermedad humana por estos dos serotipos en Arkansas fue inferior (25% y 5% respectivamente) que en el resto de los Estados Unidos (36% y 10%) (Schutze et al., 1995).

En Canadá, *S. typhimurium* ocupó el primer lugar con 20,3%, seguida de *S. enteritidis* (12,5%), *S. heidelberg* (12,0%) y *S. hadar* (10,9%) (Lior y Khakhria, 1992). Los fagotipos 8, 13 y 13a de *S. enteritidis* son los más frecuentes tanto en pollos como en humanos (Poppe, 1994). El 13 está asociado ocasionalmente con septicemia y mortalidad en pollos y se ha aislado de órganos reproductores y contenido cecal de ponedoras (Poppe et al., 1993). El fagotipo 4 no se encuentra en pollos en este país pero sí en muestras de origen humano, a diferencia de lo que ocurre en el Reino Unido donde este fagotipo ha sido aislado en 81% de fuentes humanas y en un 71% de aves de corral (Poppe, 1994).

En países más cercanos al entorno de España como Italia, *S. enteritidis* se ha convertido en los últimos años en un importante problema sanitario. Durante el

período de 1982 a 1992, el porcentaje de aislamientos de este serotipo ha aumentado de 2,4% a 57,1% en muestras de humanos y de 0,5% a 22,8% en alimentos. El fagotipo 4 responde por el 76,8% de los aislamientos.

La causa de este incremento se atribuye al consumo de productos que contienen huevos crudos o mal cocidos. Los aislamientos de alimentos se correlacionan generalmente con brotes; siendo el 60,2% aislados en huevos y derivados y el 15,3% de carne de pollo (Fantasia y Filetici, 1994).

En el sur de Italia el aumento de *S. enteritidis*, observado a partir de 1990 ha sido asociado en aproximadamente un 80% al fagotipo 4, seguido en menor frecuencia de los fagotipos 8 y 1 en muestras de origen humano de casos esporádicos y brotes; en concordancia con observaciones epidemiológicas del resto del país y de otras naciones europeas (Nastasi et al., 1993; Nastasi y Mammina, 1996).

En el Reino Unido desde mediados de los años sesenta se han observado oscilaciones en la notificación del número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos. Los brotes de infección alimentaria han sido mucho más difusos en su presentación, ocurriendo como incidentes localizados en un banquete de matrimonio, en el hogar o en la escuela, como consecuencia de los constantes cambios en el patrón nacional o internacional de distribución de alimentos.

En Inglaterra y Gales de todos los vehículos identificados de infección, la carne de pollo es una de las más importantes, respondiendo por el 54% de los brotes conocidos entre 1980-1986 (Humphrey, 1989). Este importante papel de la carne de pollo como vehículo de infección alimentaria y en particular en la salmonelosis se sigue observando en los años subsecuentes (Sharp, 1991).

A pesar de que en el Reino Unido, a comienzos de la década de los ochenta menos de un 10% de las infecciones humanas por *Salmonella* eran debidas a *S. enteritidis*, ésta aumentó hasta un 50% de los casos en 1989, dos tercios de los cuales correspondían al fagotipo 4, (Sharp, 1991) a diferencia de Estados Unidos donde están implicados fundamentalmente los fagotipos 8 y 13a (Morris et al., 1992). La

infección en humanos por fagotipo 4 de *S. enteritidis* en Inglaterra está asociada al consumo de huevos crudos o productos derivados (Cowden et al., 1989).

En Escocia entre 1980-1989 el 84% de los brotes tenían como agente causal a *Salmonellae*, identificándose la carne de pollo como responsable en un 55% de los brotes en los que fue conocido el vehículo. *S. typhimurium* fue causante de 39% del total de brotes, *S. enteritidis* del 39% y *S. virchow* del 12%. Entre 1980-1985, se aísla *S. typhimurium* con mayor frecuencia, mientras que a partir de 1986 fue más frecuente *S. enteritidis*. Otros serotipos aislados al menos con alta frecuencia en la década estudiada incluyen a: *S. stanley*, *S. heidelberg*, *S. agona*, *S. saint-paul*, *S. infantis*, *S. bredeney*, *S. hadar*, *S. panama*, *S. montevideo* y *S. anatum* (Oboegbulem et al., 1993).

Los fagotipos de *S. typhimurium* identificados con mayor frecuencia fueron el 110, 49, 10, 204, 12, 193, 66, 170 y 195. Para *S. enteritidis* fueron los fagotipos 4 y 8. Si bien, el fagotipo 8 predomina entre 1980-1985 y el fagotipo 4 a partir de 1986. El elevado número de casos por *S. enteritidis*, particularmente entre 1985-1989, corresponde a un marcado incremento en la incidencia del fagotipo 4, en especial en productos como la carne y huevos de aves (Oboegbulem et al., 1993), similar a lo que ocurre en Irlanda donde el fagotipo 4 de *S. enteritidis* es el más frecuente en pollos frescos y congelados (Wilson et al., 1996).

Por su parte, en Dinamarca la infección por *Salmonella* es la principal causa de gastroenteritis. El número de caso informados anualmente ha aumentado a partir de 1980 hasta 1988 cuando alcanzó su máximo. Los serotipos más frecuentes son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Después de 1988 se presenta una disminución en el total de casos, pero en fechas recientes la prevalencia ha aumentado nuevamente. En particular durante 1992, cuando ocurrió un aumento del 40% de los casos en comparación con 1991, aislándose *S. typhimurium* (1.397) y *S. enteritidis*(1158) (Baggesen y Wegener, 1994).

En el ganado vacuno y especialmente en las aves de corral se ha detectado un alto grado de contaminación, estando implicados estos productos alimenticios como

fuentes mayoritarias de salmonelosis humana en Dinamarca (Baggesen y Wegener, 1994).

En cuanto a *S. typhimurium*, en este país entre 1988-1993 se encuentra involucrado en el 50% de los aislamientos el fagotipo 12 (asociado más con la carne de cerdo), y los fagotipos 66 y 110 (relacionados con las aves de corral). En este período el fagotipo 12 aumenta de un 4% a 55,2%, mientras que disminuyen los fagotipos 66 de 40,1% a 3,9% y 110 de 27,8% a 4,8% (Baggesen y Wegener, 1994).

En Eslovaquia, antes de 1989 *S. typhimurium* era el serotipo más frecuente de *Salmonella*. Sin embargo, *S. enteritidis* (fagotipo 8) se ha convertido en el más frecuente desde 1990. Los resultados de la investigación epidemiológica en mataderos de aves y plantas de procesamiento en Eslovaquia indican una frecuencia de 3,4% en 1994. Los datos epidemiológicos muestran una cercana relación entre brotes por *Salmonella* en humanos y el consumo de carne de pollo, huevos crudos o mal cocidos y sus derivados (Cabada et al., 1995).

En Tailandia, un país fuera del entorno geográfico de España, se ha observado que en las dos décadas pasadas, ha ocurrido un importante incremento de los aislamientos de *S. enteritidis* a partir de 1990. Las razones a las que se atribuye este aumento de los casos humanos se relaciona con el incremento registrado en muestras de pollo y carne de pollo, desde un 1,4% en 1990 hasta 16,7% en 1993, ya que en otras fuentes no ha ocurrido aumento significativo (Sakai y Chalermchaikit, 1996)

Además, un estudio realizado por Saitanu et al. (1994) sobre la ocurrencia de *Salmonella* en pollos crudos y sus derivados en Tailandia, revela que *S. enteritidis* tenía una frecuencia del 7,9% después de *S. blockley* (12,8%) y *S. virchow* (12,5%). No se dispone de información sobre los fagotipos.

Hasta 1969 el aislamiento de *Salmonella* en casos de diarrea en Argentina estaba por debajo del 6% en comparación con otros agentes enteropatógenos; sin embargo, a partir de este año comienza a observarse un incremento que ha alcanzado un

32%, siendo *S. typhimurium* y *S. oranienburg* los serotipos que prevalecen durante varios años. A partir de 1986 aumenta de forma destacable *S. enteritidis*, poco aislada hasta la fecha, ocupando en 1990 el primer lugar y el segundo lugar tras *S. typhimurium* y *S. infantis* en 1991 y en 1992 respectivamente, en muestras de origen humano (Caffer y Eiguier, 1994).

Entre 1986 y 1993 se notifican en Argentina un total de 150 botes de infección alimentaria causados por *S. enteritidis*, en 18,6% de ellos se pudo aislar éste serotipo tanto de pacientes como del alimento involucrado. Los alimentos que contenían huevos crudos o mal cocidos, como mayonesa casera, helados y salsas fueron las principales fuentes de infección (Caffer y Eiguier, 1994).

I.8.7. RED DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EUROPEA

En Enero de 1994 se hace operativa en Europa una red de trabajo de vigilancia de salmonela en humanos: **Salm-Net**, sus objetivos son prevenir la salmonelosis humana dentro de la Unión Europea a través del fortalecimiento de la vigilancia de *Salmonella* en humanos, basada en el laboratorio y la creación de una base de datos disponible a todos los participantes. Es fundada por DG XII de la Comisión Europea bajo el Programa BIOMED 1.

Esta red de trabajo está integrada por microbiólogos y epidemiólogos, responsables de la vigilancia nacional de las salmonelas en 14 países europeos. También se pretende con esta red, unificar los esquemas de fagotipado de *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. virchow*.

Desde su puesta en marcha ha facilitado el reconocimiento e investigación de diferentes brotes en Europa. El primero por *S. agona* ligado a un alimento importado, el segundo en Marzo de 1995 por *S. tosamanga*, un serotipo muy raro, del que se dieron 28 casos humanos en seis países europeos en un período de cinco meses sin llegar a tener evidencia definitiva para implicar a un solo producto (Fisher, 1995).

El tercero de los brotes ocurrió en Noviembre de 1995 en Suiza, causado por *S. dublin* y atribuido al consumo de queso hecho con leche de vaca cruda producido en la región francesa del Doubs fronteriza con Suiza. En Diciembre, se presenta un brote en Francia por este mismo serotipo y se hace la correlación de estas dos informaciones que sugirieren que el queso podría estar asociado con el brote francés. La mayor incidencia se presenta en la zona de producción del queso. El lisotipo 43 de *S. dublin* fue aislado del queso y de 21 de los 25 pacientes franceses. Basado en estos resultados se tomaron las medidas de control pertinentes y se demostró el valor de esta red de trabajo de vigilancia internacional en la investigación de brotes (Vaillant et al., 1996).

Los datos de la vigilancia son de gran valor para identificar las tendencias en términos de la salud pública durante un período de tiempo. A corto plazo el reconocimiento y la investigación de brotes y a largo plazo las tendencias en incidencia y prevalencia de la enfermedad a fin de determinar necesidades y evaluación de las intervenciones. Es por ello que uno de los objetivos de Salm-Net es crear una base de datos europea de aislados de salmonela en humanos. Una parte de estos datos recolectados en siete países de Europa occidental (Austria, España, Escocia, Suiza, Suecia, Holanda e Inglaterra y Gales) ha sido analizado en un artículo publicado en el Eurosurveillance en el que se revisa los serotipos más frecuentes entre 1993-1995 (Fisher, 1997).

El 75% de los aislados corresponden a *S. typhimurium* y *S. enteritidis* durante los tres años estudiados, pero su incidencia relativa ha cambiado en la zona. *S. enteritidis* ha disminuido, mientras que *S. typhimurium* ha aumentado consistentemente. La aparente disminución de *S. enteritidis* puede indicar que las iniciativas de salud pública para mejorar la higiene entre los manipuladores de alimentos y el público y el control de la infección en las aves han tenido efecto. Sin embargo, todavía es una fuente significativa de enfermedad en Europa (Fisher, 1997).

La infección por *S. typhimurium* es un problema emergente. La mayoría de los aislados en Inglaterra y Gales son cepas multiresistentes, lo que reduce las opciones terapéuticas en caso de infección invasiva. Hay evidencia de cepas multiresistentes emergiendo en otros países de Europa, como Alemania, Austria (Fisher, 1997) y en Dinamarca (OMS, 1998).

I.8.8. EL PAPEL DEL COMERCIO INTERNACIONAL DE ALIMENTOS

La distribución global de los alimentos y el constante movimiento de viajeros alrededor del mundo facilita las oportunidades para ampliar la diseminación de patógenos, permitiendo la introducción de nuevos serotipos de *Salmonella* dentro de los límites geográficos de los países importadores (D'Aoust, 1994).

En el mercado de importación-exportación figuran como principales vehículos para la infección humana, las frutas y vegetales frescos, las especias, quesos y productos de acuicultura.

En un estudio exhaustivo de 1.5 millones de cepas de *Salmonella* de origen humano y no humano aisladas entre 1934 y 1975 en 109 países, Kelterborn (1979) encuentra claramente a *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. newport* y *S. dublin* como los serotipos predominantes en el período de análisis. Sin embargo, no se puede desestimar el riesgo potencial para la salud de los alimentos contaminados con cualquiera de los más de 2000 serotipos de *Salmonella* restantes (D'Aoust, 1994).

La ubicuidad de las salmonelas en el medio natural y en varios sectores de la industria agro-alimentaria subraya la importancia de estos patógenos en la cadena alimentaria en general y su papel como agentes causantes de enfermedad humana. Esto se ve claramente en los registros epidemiológicos nacionales de países como Francia, España, Inglaterra y Gales, donde el número de brotes de infección alimentaria por *Salmonella* tiende a hacerse cada vez mayor frente a otras bacterias patógenas (D'Aoust, 1994).

El marcado aumento de la población humana ha impuesto mayores demandas a los productores agro-alimentarios. Aunque las prácticas intensivas de cultivo han demostrado ser técnicamente factible y comercialmente viables, el método tiende a disminuir la calidad y seguridad de los alimentos obtenidos. Por ejemplo, las prácticas de manejo aplicadas a la industria avícola verticalmente integrada favorece

la presencia de alto grado de contaminación en los canales. Algo similar puede decirse que ocurre en la industria cárnica de porcino y bovino.

Un fenómeno secundario a la importación de productos contaminados con *Salmonella* es la emergencia y subsecuente persistencia o desaparición de nuevos serotipos en la población humana a escala nacional. Por ejemplo, *S. agona* fue por primera vez introducida en Inglaterra y Gales en 1969 a través de la importación de de pescado contaminado procedente de Perú, diseminándose este serotipo rápidamente en las granjas de aves de corral y ganado porcino (McConnell et al., 1973). Una situación similar ocurrió en Italia y en Estados Unidos, donde también el pescado de origen peruano fue el responsable de la introducción de *S. agona*. En Estados Unidos este microorganismo tiene un pico de incidencia en 1976, con una progresiva disminución entre 1976-1988 (Fox, 1974).

S. hadar es otro ejemplo del potencial impacto de las prácticas de agricultura sobre la dinámica de las infecciones humanas por *Salmonella*. Desde su aparición en pavos a través del uso de piensos contaminados, éste serotipo inmediatamente se convirtió en uno de los agentes importantes de enfermedad humana en Inglaterra y Gales desde 1970-1978 (Rowe, 1980). Tiene un pico de incidencia en 1978, tras el cual el número de infecciones humanas atribuidas a *S. hadar* disminuye rápidamente en los años siguientes hasta un rango similar al que tenía a su emergencia.

Otro ejemplo es el serotipo *S. eastbourne* que fue introducido en Estados Unidos y Canadá después del mayor brote de salmonelosis humana por chocolate con leche contaminado (Craven et al., 1975). La incidencia de éste agente infeccioso alcanza su pico en 1974 en ambos países y retorna rápidamente a niveles bajos de ocurrencia, sugiriendo que el organismo no encontró un nicho ecológico adecuado para su supervivencia y proliferación.

Esta creciente demanda mundial de alimentos ha llevado a un mayor movimiento internacional de productos alimenticios. Los comestibles de países del tercer mundo no siempre alcanzan la calidad bacteriana de aquellos producidos en naciones más industrializadas debido a las deficientes condiciones sanitarias que

prevalecen en estas zonas geográficas y al limitado control aplicado a los productos exportados. Esta situación representa un claro reto para las agencias reguladoras y mayoristas, a la vez que un mayor riesgo para los consumidores de los países importadores (D'Aoust, 1994).

I.9. DIAGNÓSTICO

I.9.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO EPIDEMIOLOGICO

La salmonelosis es una enfermedad bacteriana prácticamente indistinguible de la causada por otros enteropatógenos. Es considerada una enfermedad transmitida por alimentos, debido a que su modo de transmisión predominante son los alimentos contaminados. Comúnmente se manifiesta como una enterocolitis aguda con aparición brusca de cefalea, cólicos, diarrea, náuseas y a veces vómitos. Puede haber deshidratación severa, especialmente en niños. Casi siempre se acompaña de fiebre. La anorexia y diarrea a menudo persisten varios días.

Sólo una pequeña proporción de casos se diagnostican clínicamente, y a penas un 1% de estos se notifica. La incidencia es mayor en niños, pero la enterocolitis por *Salmonella* puede presentarse en forma de pequeños brotes en la población general. No obstante, la mayoría de los casos de salmonelosis ocurren en adultos sin que aparezca ningún tipo de síntomas o sólo presenten cefaleas y ocasionales deposiciones diarreicas. Estos casos no son diagnosticados, salvo que se busquen en el transcurso de una investigación epidemiológica de un brote colectivo, pero dada la sintomatología leve y la evolución autolimitada, la gran mayoría de los pacientes no reciben atención médica y gran parte de los que se presentan fuera de brotes epidémicos, son diagnosticados como gastroenteritis víricas.

En cuanto a las formas sintomáticas, aún permanecen sin aclarar pese al estudio intensivo de las infecciones por *Salmonella*, los mecanismos por los cuales las salmonelas no typhi causan enterocolitis (Miller et al., 1995).

La clínica aparece de forma súbita después de la ingestión de un número elevado de bacterias vivas (10^5 - 10^6) y por lo general tras un período de incubación de 6-48 horas, caracterizado por diarrea de moderado volumen en la mayoría de los casos, sin sangre ni moco, ocasionalmente muy acuosa. Náuseas y vómitos de variable volumen e intensidad, dolor abdominal tipo cólico y febrícula (38°C). En

casos graves puede aparecer fiebre alta y sangre en las heces y deshidratación. La diarrea a veces va precedida de escalofríos y cefalalgía.

Otros síntomas de la enfermedad son abatimiento, debilidad muscular, mialgías, lasitud y somnolencia. La intensidad de los síntomas puede oscilar desde un ligero malestar y la existencia de diarrea hasta la muerte en 2-6 días, siendo la mortalidad muy baja, menor del 1%, excepto en los muy jóvenes, ancianos e inmunodeficientes. Sin embargo, la morbilidad y sus costos asociados pueden llegar a ser muy altos.

Los síntomas suelen persistir durante 2-3 días, aunque algunos autores consideran de 3 a 15 días, transcurridos los cuales la enfermedad cura espontáneamente sin complicaciones, bastando sólo una terapia sintomática, aunque a veces se puede prolongar durante semanas e incluso meses.

Al inicio de la enfermedad, particularmente en niños pequeños y ancianos puede producirse una bacteriemia transitoria que pasa clínicamente desapercibida y que por el contrario suele ser persistente y grave en pacientes con enfermedades debilitantes, dando entonces la sintomatología característica de la sepsis por organismos gram-negativos (fiebre alta, escalofríos, leucocitosis o leucopenia, que puede evolucionar a hipotensión con frialdad en los pies, cianosis y progresar a shock séptico).

A partir de la infección inicial, además de poder desarrollarse una septicemia, también puede ocurrir una infección focal. El agente infeccioso puede, raramente, localizarse en los tejidos del organismo, produciendo abscesos y causando artritis séptica, colecistitis, endocarditis, infección intravascular, meningitis, pericarditis, neumonía, osteomielitis, piodermatitis o pielonefritis (Benenson, 1990).

Después de resolverse la gastroenteritis, la excreción de salmonelas no typhi en las heces dura de 4-5 semanas. Menos del 10% de los pacientes convalecientes excretan con las heces salmonelas más allá de la décima semana.

La salmonelosis puede presentarse como casos esporádicos o como casos pertenecientes a un brote epidémico.

Un **“brote de enfermedad transmitida por alimentos”** se define como un *incidente en el cual dos o más personas padecen una enfermedad de características similares como resultado de la ingestión de un alimento común.*

Antes de 1992, existían tres excepciones para esta definición: un caso único de botulismo, la intoxicación por químicos, o los envenenamientos por toxinas de origen marítimo constituían un brote de enfermedad transmitida por alimentos si se demostraba su etiología. Desde inicios de 1992, se considera un brote de enfermedad transmitida por alimentos a dos o más personas que enfermen por estas causas (Bean et al., 1996).

Para llegar al diagnóstico clínico epidemiológico de un caso esporádico o brote de salmonelosis ha de tenerse en cuenta el período de incubación, los signos y síntomas presentes en él o los pacientes y los criterios microbiológicos de confirmación, una vez que se ha hecho el diagnóstico diferencial con otras enfermedades de origen microbiano transmitidas por alimentos.

El período de incubación de la salmonelosis está entre 6 horas y 10 días, habitualmente 6-48 horas y los síntomas suelen ser diarrea, a menudo con fiebre y dolores abdominales (Bean et al., 1996).

Los objetivos de la investigación epidemiológica que se realiza ante todo brote o situación epidémica son conocer la extensión y magnitud del brote; identificación de los alimentos implicados; aislamiento del agente causal y la fuente de contaminación y determinar los factores que contribuyeron a la presencia, crecimiento y supervivencia de los agentes etiológicos. El fin principal de ésta investigación es adoptar, lo más pronto posible, las medidas necesarias y oportunas que eviten la distribución, venta o consumo del alimento implicado, para así controlar el brote y evitar la aparición de nuevos casos.

Otros fines son orientar el tratamiento y establecer las medidas preventivas para evitar futuros brotes al poder intervenir sobre los factores contribuyentes.

Los elementos de una buena investigación epidemiológica son el *estudio descriptivo*, *el análisis epidemiológico de los factores de exposición*, *el estudio medioambiental y de higiene de los alimentos* y *el estudio analítico*.

El estudio descriptivo servirá para caracterizar el brote en términos de tiempo, lugar y persona. La descripción del tiempo debe recoger el momento (hora y día) en que comenzaron los síntomas y se consumió el alimento sospechoso. Permite identificar el momento de inicio y finalización del suceso ocurrido, conocer el período de incubación y establecer la hipótesis acerca del microorganismo responsable y del momento en que ocurrió la exposición.

La descripción del lugar recoge la localización geográfica de los casos y orienta hacia la magnitud y extensión del brote. Permite establecer la hipótesis acerca del lugar donde se produjo la contaminación del alimento y conocer los aspectos relevantes referidos al sistema de abastecimiento de los alimentos implicados en la zona afectada.

Por último, la descripción de las características de persona: edad, sexo, síntomas, ocupaciones, etc. Con estos datos se puede realizar el diagnóstico de la enfermedad y además conocer cual fue la población expuesta y sus experiencias comunes: alimentos consumidos, fuentes de abastecimiento y otras actividades, que permitirán conocer la fuente de infección y el modo de transmisión del brote. Con los datos obtenidos en el estudio descriptivo se establecerán la hipótesis acerca del microorganismo implicado, la fuente de infección y el modo de transmisión.

El análisis epidemiológico de los factores de exposición, que no son más que el factor al que estuvieron expuestos o todos los alimentos consumidos por todas las personas, tanto las que enfermaron como las que no enfermaron, para buscar la causa del brote mediante la identificación de asociaciones causales y la medición a

través de pruebas estadísticas de magnitud, precisión y significación de dicha asociación. Esto servirá para confirmar la hipótesis y conocer lo ocurrido.

Tanto el estudio descriptivo como el análisis epidemiológico se realizan basándose en los datos obtenidos en las encuestas epidemiológicas, un modelo de éstas es la Encuesta alimentaria de la Dirección General de Salud Pública del Servicio Canario de Salud.

Las encuestas son fundamentales en toda investigación y permiten adoptar las medidas de control del brote. Es importante que se cumplimenten todos los apartados de la misma, es función del personal médico y de enfermería y debe realizarse a todas las personas que estuvieron expuestas al mismo acontecimiento. La información básica es la siguiente: nombre, apellidos, dirección y teléfono (de al menos una de las personas afectadas del núcleo familiar); fecha de la ingestión de la comida sospechosa (día y hora) y fecha de comienzo de los síntomas (día y hora); síntomas presentados; alimento/s sospechoso/s (en caso de no sospecharse se recogerá información de todos los alimentos consumidos en los tres días anteriores); lugar donde se compró, realizó, o consumió la comida sospechosa o sus ingredientes (nombre y dirección), evolución del paciente y tipo y fecha de recogida de muestras del paciente.

Es necesario y muy importante realizar la encuesta no sólo a todas las personas afectadas (aunque presenten síntomas ligeros), sino además a todas las personas que estuvieron expuestas al alimento sospechoso aunque no presenten síntomas, ya que es la única manera de poder hacer un estudio adecuado de las causas del brote (mediante estudio de cohortes o caso-control).

La investigación epidemiológica debe incluir también **el estudio medioambiental y/o de higiene de los alimentos**; es decir, el estudio pormenorizado de las condiciones higiénico sanitarias y del proceso de elaboración, conservación y distribución realizado en las empresas, instituciones o comedores implicados, cuando el origen sea un alimento contaminado. Con ésta información se podrá conocer los factores condicionantes del brote.

El estudio analítico comprende el análisis microbiológico de muestras procedentes de pacientes y alimentos. Es importante realizar una recogida de muestra oportuna y adecuada, ya que el aislamiento del microorganismo implicado ayuda a confirmar la hipótesis. Actualmente existen técnicas más complejas, como el estudio de fagotipos y métodos genotípicos que permiten conocer si la cepa encontrada en los pacientes es la misma que la encontrada en el alimento o en el manipulador y, por tanto conocer el origen del brote (Buisson, 1992; Dirección General de Salud Pública, Servicio Canario de Salud,1998).

I.9.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Numerosos serotipos de *Salmonella* son patógenos tanto para el hombre como para los animales. Existen muchas variaciones en la prevalencia relativa de los diferentes serotipos de un país a otro; en la mayoría de los países que disponen de mecanismo de vigilancia de *Salmonella*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* son los serotipos más frecuentes. De los más de 2000 serotipos conocidos, sólo un pequeño número es responsable de la mayoría de los casos confirmados en una zona geográfica determinada (Benenson, 1990).

En caso de septicemia, *Salmonella* podrá ser aislada en un medio entérico a partir de heces y sangre durante los estadios agudos de la enfermedad. En caso de enterocolitis, la excreción fecal usualmente persiste por varios días o semanas tras la fase aguda de la enfermedad; la administración de antibióticos puede aumentar la duración del período de excreción de microorganismos (Benenson, 1990).

Para la detección de infecciones asintomáticas, se prefiere contar con 3-10 gramos de material fecal en lugar del hisopado rectal. Las muestras deben recogerse durante varios días ya que la excreción de los microorganismos suele ser intermitente. Las pruebas serológicas no son útiles para el diagnóstico (Benenson, 1990).

El laboratorio de bacteriología es imprescindible para la confirmación del diagnóstico clínico epidemiológico. **Los criterios de confirmación de un brote de salmonelosis son:** *aislamiento del mismo serotipo de salmonela no typhi en muestras clínicas de dos o más enfermos o el aislamiento del microorganismo en el alimento implicado por investigación epidemiológica* (Bean et al., 1996).

I.9.2.1. AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN MUESTRAS CLÍNICAS

Para el aislamiento de *Salmonella*, usualmente, es suficiente con los medios selectivos y diferenciales de rutina. Pueden usarse tanto medios entéricos

diferenciales como MacConkey o Eosina-Azul de Metileno, como un agar moderadamente selectivo como el *Salmonella-Shigella*, Xilosa-Lisina-Desoxicolato, o Hektoen. Los ágaros altamente selectivos como el Verde Brillante y el Sulfito Bismuto pueden ser reservados para el caso de brotes. El agar Verde Brillante es bueno, especialmente, para el aislamiento de *Salmonella* spp. (a excepción de *S. typhi* y *S. paratyphi*) y el agar Sulfito Bismuto es efectivo para el aislamiento de *S. typhi*.

Puede ser usado un caldo de enriquecimiento, como el selenito, para facilitar la recuperación de pequeñas cantidades de *Salmonella* y *Shigella* spp. Sin embargo, los caldos de enriquecimiento no tienen una relación costo beneficio suficiente para incluir su uso de rutina, excepto en caso de brotes, cuando se requiere la investigación en portadores y en otras situaciones clínicas (Gray, 1995).

1.9.2.2. AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.

La única vía de entrada de la *Salmonella* en el cuerpo humano es la oral, por lo que es de suma importancia el análisis de los alimentos para detectar su presencia. La detección de patógenos transmitidos por alimentos es complicada, debido al bajo número de organismos de interés que a menudo están presentes en una compleja flora microbiana y a la variada composición de los alimentos. En los alimentos, la simple presencia de un patógeno es considerada significativa. Por ello, los métodos y los medios deben ser capaces de permitir que el crecimiento ocurra a partir de un número extremadamente bajo de células iniciales (Tietjen y Fung, 1995).

Existe una serie de métodos recomendados por expertos, sin embargo aún no es posible ni garantizar la recuperación de todos los serotipos de *Salmonella* a partir de los diferentes productos alimenticios (sometidos a variadas condiciones de preparación y conservación), ni obtener resultados analíticos inmediatos. Disponemos de algunos procedimientos estandarizados por diferentes organismos reguladores, algunos de los cuales se especifican en la Tabla 5. Estos procedimientos, en su mayoría, han sido establecidos después de pruebas realizadas en estudios

cooperativos y muchos tienen reconocimiento internacional. No existe una única metodología que pueda aplicarse a todos los alimentos y en todas las circunstancias.

Los métodos tradicionales para el aislamiento e identificación de *Salmonella* en alimentos pueden ser divididos en seis etapas sucesivas:

1. Enriquecimiento no selectivo
2. Enriquecimiento selectivo
3. Siembra en placa de medios sólidos selectivos y diferenciales
4. Estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas, en los medios adecuados
5. Análisis antigénico, en dos fases: a) uso del antisuero polivalente *O* y el antisuero polivalente *H*, y b) utilización de los antisueros específicos de grupo *O* y *H*
6. Tipificación por medio de bacteriófagos

Los pasos del 1 al 3 se refieren al aislamiento y del 4 al 6 a la identificación. El paso 1 tiene como fin la revitalización de las salmonelas dañadas por las diferentes condiciones de tratamientos industriales o de almacenamiento. El 2 es de enriquecimiento selectivo y sirve para favorecer el crecimiento de *Salmonella* en un ambiente que puede contener un gran número de bacterias diferentes. El paso 3 permite la visualización de las colonias sospechosas, por su aspecto característico. El paso 4 se refiere a la identificación bioquímica. El 5 conduce, por medio de pruebas serológicas, a la identificación definitiva de las cepas sospechosas como miembros del género *Salmonella*. El paso 6 logra una identificación aún más exacta de los microorganismos aislados, identificación que es de particular interés para propósitos epidemiológicos, ya que los tipos serológicos de un grupo fágico común suelen tener

el mismo origen y, a la inversa las cepas que presentan igual estructura antigénica, pero diferente grupo fágico, son probablemente de diferente origen.

Anteriormente, el enriquecimiento selectivo se utilizaba sólo cuando se creía que un tratamiento como el calentamiento, la deshidratación, la irradiación, la congelación o ciertas condiciones como el pH bajo, habían lesionado las salmonelas en los alimentos. Edel y Kampelmacher (1973) y Gabis y Silliker (1974) señalan que incluso en muestras de alimentos, tales como carne cruda o huevo líquido, el pre-enriquecimiento de la muestra en un medio no selectivo da como resultado el aislamiento de más salmonelas que en el caso de la siembra directa en un medio de enriquecimiento selectivo. En base a estas experiencias, actualmente, la mayoría de los organismos reguladores recomiendan que todas las muestras sean pre-enriquecidas en un medio no selectivo antes de pasarlas a uno de enriquecimiento selectivo.

El enriquecimiento no selectivo, tradicionalmente, se ha realizado por cultivo de las muestras en caldo lactosado. Esta práctica fue iniciada por North en 1961 para el análisis de la clara de huevo desecada. Posteriormente, diversos investigadores han estudiado modificaciones en la composición del medio de pre-enriquecimiento y han llegado a la conclusión de que su composición no es tan crítica como se suponía. Así, por ejemplo, investigadores europeos han utilizado normalmente agua de peptona tamponada (Edel y Kampelmacher, 1968) en lugar de caldo lactosado, siendo, en general, ambos medios intercambiables.

Un caldo de enriquecimiento selectivo estimula la multiplicación de las salmonelas y reduce o inhibe el crecimiento de los organismos competitivos, tales como coliformes, *Proteus* y *Pseudomona*, cuyo crecimiento superaría al de *Salmonella*, en particular si estos organismos competidores están presentes en el alimento en un número mucho mayor que ellas. El uso de más de un medio selectivo, así como la temperatura de incubación, puede afectar de forma importante el porcentaje de recuperación de *Salmonella*. Los organismos reguladores recomiendan

diferentes medios de enriquecimiento selectivo y la temperatura de incubación de 43°C.

Los ágaros selectivos, generalmente, contienen sustancias inhibidoras que hacen a los medios selectivos y un sistema indicador que colorea las colonias o el medio que las rodea, lo que hace al medio diferencial, es decir, capaz de diferenciar caracteres bioquímicos de las colonias que crecen en él. Los laboratorios tienen, a veces, preferencias por determinados medios diferenciales; con los que obtienen los mejores resultados en su experiencia. Entre los medios que pueden utilizarse están el agar sulfito bismuto, el agar verde brillante, agar verde brillante sulfadiazina, verde brillante de MacConkey, agar desoxicolato citrato, agar *Salmonella-Shigella*, etc.

La identificación de una cepa como miembro del género *Salmonella* está dentro de la capacidad de cualquier laboratorio que posea los medios y los antiseros disponibles en el mercado. Los laboratorios que realizan la detección rutinaria de *Salmonella* en alimentos, utilizan pruebas bioquímicas, para explorar las cepas sospechosas y, posteriormente, someten dichas cepas a pruebas serológicas para determinar si son efectivamente *Salmonellae*. La identificación definitiva de las salmonelas como pertenecientes a un determinado serotipo, requiere envío de las cepas a un centro especializado en tipificación.

Las colonias sospechosas de ser *Salmonella* sobre las placas de agar son investigadas bioquímicamente mediante una batería de diferentes pruebas para reducir el número de aislamientos que deberán ser tipificados, lo que constituye un procedimiento mucho más laborioso. Aunque ciertas pruebas deben hacerse, una extensa investigación bioquímica a menudo depende del número de aislamientos que van a ser analizados y del interés del analista (Andrews, 1995).

Los medios de triple azúcar hierro (TSI) y lisina hierro (LI) y las pruebas de la ureasa y el indol son ampliamente utilizados en procedimientos analíticos convencionales. La presencia de glucosa y de un sistema de detección de H₂S en el TSI facilitan la identificación de organismos no fermentadores de glucosa, presumiendo la presencia de *Salmonella*. El medio LI es de igual valor diagnóstico

debido a que investiga la presencia del enzima lisina descarboxilasa, frecuente en *Salmonella spp.* (Tietjen y Fung, 1995). En la actualidad existen estuches comerciales que caracterizan bioquímicamente los aislados, para un diagnóstico apropiado de forma rápida.

El serotipado es el paso definitivo, se utiliza una técnica serológica para la identificación específica de los cultivos. En el examen serológico de *Salmonella* por análisis antigénico, se utiliza un método de aglutinación. Los antígenos *O*, ó antígenos somáticos termoestables de la bacteria son identificados en primer término, usando un método de aglutinación en porta. Acompañado del uso de antisuero *O* representativo de todos los antígenos termoestables que poseen los miembros del género.

El uso de antisueros específicos permite la determinación del serogrupo al que pertenece el cultivo. Esta determinación va seguida del uso de antisuero absorbido de factor único cuando se requiere. Los antígenos *H* de *Salmonella* son determinados por uso selectivo de un antisuero representativo de los antígenos *H* del género. A diferencia del antisuero *O*, el antisuero *H* se usa en una técnica de aglutinación en tubo (Tietjen y Fung, 1995).

Tabla 5. Medios de cultivo a utilizar en procedimientos para la detección de *Salmonella* según algunos organismos reguladores

Organismo	Medios de Cultivo		
	Pre-enriquecimiento	Enriquecimiento	Placas de Aislamiento
ISO	Agua peptona tamponada	Caldo Rappaport-Vassiliadis Caldo selenito-cistina	Agar verde brillante
APHA	Caldo lactosado	Caldo de selenito Caldo tetracionato	Agar S-S Agar sulfito-bismuto Agar Hektoen
AOAC/FDA	Caldo lactosado Caldo triptono-Soja Caldo nutritivo	Caldo de selenito Caldo tetracionato	Agar verde brillante Agar sulfito-bismuto Agar Hektoen Agar XLD
IDF	Agua peptona tamponada Agua destilada más verde brillante 0,002%	Muller-Kauffman Caldo de selenito-cistina Caldo tetracionato	Agar verde brillante Agar sulfito-bismuto
BSI	Agua peptona tamponada	Caldo Rappaport-Vassiliadis Caldo selenito-cistina	Agar verde brillante o cualquier otro medio selectivo
ICMSF	Agua peptona tamponada Caldo lactosado	Caldo selenito-cistina Caldo tetracionato-verde brillante	Agar sulfito-bismuto Agar verde brillante o cualquier otro medio selectivo
CeNaN	Agua peptona tamponada	Rappaport-Vassiliadis Muller-Kauffman Caldo selenito-cistina	Agar XLD Agar verde brillante Agar Hektoen Agar sulfito-bismuto Agar S-S

ISO: International Organization for Standardization (Organización Internacional de estandarización)

APHA: American Public Health Association (Asociación Americana de Salud Pública)

AOAC/FDA: Association of Official Analytical Chemists/U.S. Food and Drug administration (Asociación Oficial de Analítica Química/ Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos) **IDF:** International Dairy Federation (Federación Internacional de Alimentación)

BSI: British Standards Institute (Instituto Británico de Estándares)

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for foods of the International Association of Microbiological Societies (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos de la Asociación Internacional de Sociedades Microbiológicas)

CeNaN: Centro Nacional de Nutrición

I.9.3. MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE *SALMONELLA* EN ALIMENTOS

Los métodos de detección rápida de *Salmonella* en muestras de alimentos han sido objeto de investigación desde inicio de los años ochenta, existiendo un gran interés de los microbiólogos por desarrollar estos métodos.

Una “**prueba rápida**” de microbiología alimentaria se define como *aquella capaz de ser realizada de forma completa en un período de 4 a 12 horas*. Las pruebas “**muy rápidas**” han sido definidas por Jarvis (1984) como *aquellas que se completan en menos de 1 hora*.

La rapidez de los métodos de detección permiten a la industria alimentaria reducir los costos de almacenamiento y aumentar las pruebas, tanto de la materia prima como del producto final, en especial de aquellos que tienen una vida útil relativamente corta.

Actualmente, existen varios sistemas comerciales de análisis mediante nuevas tecnologías para facilitar la identificación de *Salmonella* en alimentos. Estos pueden ser divididos en cinco categorías: **pruebas bioquímicas miniaturizadas, nuevos medios, sistemas automatizados, pruebas basadas en ácidos nucleicos y pruebas basadas en anticuerpos**.

A pesar de la tecnología, muchas de las técnicas incluidas dentro de los métodos rápidos de detección de *Salmonella*, todavía se apoyan en métodos de cultivo para la resuscitación de las células dañadas y la amplificación selectiva de la población de *Salmonella* en los caldos de cultivo. De ahí, que los procedimientos de pre-enriquecimiento o enriquecimiento selectivo, o alguna combinación de ellos, deban ser usados conjuntamente con estos métodos rápidos para mayor sensibilidad y especificidad.

La mayoría de estos sistemas (Tabla 6) son pruebas de tamizaje y solamente son útiles para la identificación presuntiva de *Salmonella*. Por tanto, resultados negativos, se consideran definitivos, pero los resultados positivos deben ser confirmados por métodos convencionales y serológicos (Tietjen y Fung, 1995).

Tabla 6. Métodos rápidos para la detección de *Salmonella* en alimentos

Métodos y Materiales	Características	Fabricante
Pruebas Miniaturizadas: API 20E Enterotube Enterobacteriaceae Set II MICRO-ID	Bioquímicos	Analytab Roche Diagnostic Systems BBL Organon Teknika
Medios: HGMF/EF-18 MSRV OXOID SRT Agar Rambach	Selectivos y diferenciales	QA Life Sciences Varios OXOID, Unipath Technogram
Basados en los ácidos nucleicos: DNAH	Sonda de ADN	GENE-TRAK
Basados en anticuerpos: OXOID MicroScreen Spectate Bactigen Assurance TECRA Salmonella-Tek Salmonella 1-2 Test	Aglutinación al látex ELISA, policlonal ELISA, monoclonal Inmunodifusión	OXOID Mercia May & Baker Wampole Biocontrol Bioenterprises Organon Teknika Biocontrol
Instrumentación: GNI VIDAS Malthus	Bioquímico ELFA Conductancia	BioMérieux Vitek BioMérieux Vitek Malthus Instruments

ELISA: Enzimo Inmuno Ensayo; **ELFA:** Enzayo Enzimo Fluorescente

I.9.4. MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN: MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS

Cuando aislamos un serotipo de *Salmonella* es conveniente tipificarla lo más completamente posible. Hoy en día los marcadores epidemiológicos de *Salmonella* tienen gran interés sanitario, ya que pueden contribuir a la determinación de la diseminación microbiana en el tiempo y en el espacio, aclarando en muchos casos la historia natural de la enfermedad, estableciendo las diferencias entre cepas endémicas de un área geográfica y otras de tipo epidémico; y ayudando al sanitario en la determinación de la cadena epidemiológica en cada brote de infección alimentaria. Por otra parte, también interesa porque nos permite establecer asociaciones entre unos y otros casos, y de estos con el o los alimentos u otros vehículos involucrados en un determinado lugar y tiempo.

Un sistema ideal de tipificación debería estar estandarizado; tener una precisión establecida, ser reproducible; estable en el tiempo; suficientemente sensible (para distinguir organismos que son similares pero no idénticos), ser ampliamente aplicable, disponible, económico; y de valor probado basado en la investigación epidemiológica (Aber y Mackel, 1981). Ningún método es el ideal y la mayoría de las investigaciones epidemiológicas requieren más de un método de tipificación para una óptima delineación de la cepa (Meitert y Meitert, 1978; Brokop y Farmer, 1979; Crichton y Old, 1980; Aber y Mackel, 1981; Archer y Mayhall, 1983; Christensen et al., 1983; Holmberg et al., 1984; Parisi, 1985; Hartstein et al., 1987; Hawkey, 1987; Edelstein et al., 1986; Farmer, 1988; Hunter et al., 1988; Gargallo-Viola, 1989). Por tanto, se debe tener una sólida guía epidemiológica para no caer en una indiscriminada aplicación de estos métodos con resultados conflictivos y confusos (Pfaller, 1991).

Los sistemas de tipificación están basados en la premisa que aislamientos clónicamente relacionados comparten características por las cuales ellas pueden ser diferenciados de aislamientos no relacionados. La utilidad de una particular

característica de tipificación está en relación con su estabilidad dentro de una cepa y su diversidad dentro de las especies (Arbeit, 1995).

Los marcadores epidemiológicos se clasifican en dos grandes grupos: **fenotípicos y genotípicos**, dependiendo de la técnica que se utilice. Existen numerosas publicaciones acerca de su aplicación en el estudio de la epidemiología molecular de las salmonelas. Su aplicación es de utilidad en la investigación de brotes de salmonelosis, en estudios de resistencias a antimicrobianos y de las consecuencias del uso de éstos en la alimentación animal; en el estudio del cambio del patrón de clonas de *Salmonella* en determinadas zonas geográficas; análisis molecular de los genes de virulencia de *Salmonella*; etc.

I.9.4.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS

Son los métodos clásicos para diferenciación de aislamientos, están basados en la presencia o ausencia de características biológicas o metabólicas expresadas por los organismos, ejemplo de ellos son el biotipo, el antibiograma, los serotipos y fagotipos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas y están limitados por la capacidad de los microorganismos de alterar la expresión de sus genes subyacentes (Wachsmuth, 1985). Tales cambios pueden ocurrir de forma impredecible o en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Mekalanos, 1992). Usualmente, se recomienda hacer uso de alguno de ellos conjuntamente con algún marcador de tipo genotípico (Arbeit, 1995).

Aunque estos métodos son de valor para la caracterización de cepas tienen el inconveniente de ser específicos para cada organismo, requiriendo el uso de un grupo de reactivos y procedimientos. El serotipado y fagotipado requieren reactivos especializados que suelen estar disponible sólo en pocos laboratorios de referencia.; por ejemplo, sueros absorbidos, fagos y cepas bacterianas para la propagación de fagos (Swaminathan y Matar, 1993).

Biotipado: La biotipología está basada en propiedades tales como diferencia en reacciones bioquímicas, morfología y tolerancia ambiental (Pfaller, 1991). Ejemplo de ello, son los diferentes patrones de fermentación que presentan determinadas cepas de un mismo serotipo frente a ciertos azúcares o alcoholes; y la habilidad para crecer a un pH o temperatura extremos (Badalia et al., 1976; Pohl et al., 1983; Pohl et al., 1984; Pfaller, 1991). Estas propiedades están determinadas por la presencia o ausencia de enzimas y, por tanto, son definidas genéticamente. Los biotipos pueden servir como marcadores epidemiológicos siendo, especialmente, útil en el caso de cepas sin plásmidos o fagotipos no tipables. Ejemplo, de un biotipo basado en reacción bioquímica es el carácter lactosa (+) y lactosa (-) de la cepa de *Salmonella* estudiada (Le Minor, 1984).

Debido a que la mayoría de los sistemas de identificación disponibles comercialmente están basados en reacciones bioquímicas, un perfil bioquímico o biotipo puede ser generado como parte de un proceso de identificación de rutina. Con fines de análisis, las reacciones bioquímicas en la mayoría de los sistemas comerciales están reducidos a un código numérico, de este modo un número de biotipo puede ser utilizado como un medio de identificación de cepas.

La ventaja de utilizar los métodos comerciales de biotipado es que están estandarizados y de realización relativamente fácil. Desafortunadamente los sistemas comerciales fueron diseñados con fines taxonómicos y no epidemiológicos, de ahí, la falta de sensibilidad y suficiente reproductibilidad de las reacciones individuales del método para ser de amplio uso como sistema epidemiológico de tipado (Butler et al., 1975; Murray, 1978; Barry et al., 1979; Golmand y Macone, 1980; Christensen et al., 1983; Farmer, 1988; Hébert et al., 1988).

Los sistemas no comerciales de tipado son, en general tediosos y de difícil control, y además de carecen de estandarización. Por último, independientemente de los sistemas usados, el biotipo no es una propiedad que se pueda considerar estable, ya que podría verse influenciada por diversos factores técnicos y ambientales, así como por el hecho de ganancia o pérdida de plásmidos (Bentley et al., 1968; Reeve et al., 1973; Grimont y Grimont, 1978; Meitert y Meitert, 1978; Murray, 1978; Barry et al., 1979; Goldman y Macone, 1980; Aber y Mackel, 1981; Hébert et al., 1988).

Tipado por bacteriocinas: La diferenciación de cepas dentro de especies por bacteriocinotipia se basa en la sensibilidad diferencial de las cepas probadas a las bacteriocinas o toxinas producidas por un grupo de cepas productoras seleccionadas. A pesar de no ser de uso común, puede ser un método útil para el tipado de microorganismos difícilmente tipables por otros métodos (Wuhte y Brandeker, 1983; Sharma et al., 1984; Vicente y Almeida, 1984; Vinhas y Almeida, 1984).

Una de las mayores ventajas del tipado por bacteriocinas es que éste puede aumentar la sensibilidad de tipado epidemiológico cuando se usa en combinación con

otros sistemas de tipado como el serotipado, antibiograma o biotipado (Pfaller, 1991).

Esta técnica sufre la falta de estandarización y pobre reproductibilidad (Pfaller, 1991). Debe ser controlada en extremo y su variabilidad puede ser tal que sólo pueden ser comparados aislamientos en la misma prueba (Reeves, 1965; Meiter y Meiter, 1978; Aber, 1981). Es de uso limitado en laboratorios de referencia.

Antibiogramas: La antibiotipia utiliza los patrones de sensibilidad o resistencia que presentan cepas de *Salmonella* frente a los antibióticos, ayudándonos a establecer subdivisiones entre ellas: antibiotipos, que a veces son suficientes para confirmar la relación epidemiológica entre diferentes aislamientos (Pfaller, 1991).

El antibiograma es atractivo como método epidemiológico de tipado, debido a su disponibilidad, fácil ejecución, relativamente económico y aplicabilidad a diferentes grupos de organismos. Tanto en dilución en caldo como en difusión en placa están cuidadosamente estandarizados y son, por lo tanto, reproducibles entre y dentro de diferentes laboratorios (Barry et al., 1979; Jones, 1982; NCCLS, 1984; NCCLS, 1985).

La sensibilidad del antibiograma para fines epidemiológicos depende del microorganismo, el número y tipo de antibióticos probados, y la forma en que los resultados son informados (Pfaller, 1991).

Las desventajas del antibiograma como método de tipado epidemiológico incluye la limitada sensibilidad, tanto para organismos altamente resistentes, como para los altamente sensibles, la inestabilidad del patrón de susceptibilidad debido a la presión antibiótica, factores ambientales y la ganancia o pérdida de plásmidos que carguen los factores de resistencia (Meitert y Meitert, 1978; Parisi, 1980; Schaberg et al., 1981; Aber, 1981; Parisi, 1985; Galeto et al., 1987; Mickelsen et al., 1988).

Los sistemas de antibiotipado y tipado por bacteriocinas son los más inestables debido a que suelen estar determinados por componentes extracromosómicos, cuya pérdida o adquisición puede ocasionar cambios.

No hay un consenso para decir cuanta diferencia entre antibiogramas es necesaria para distinguir cepas no relacionadas. Problema que se complica por el creciente número de antibióticos nuevos de los que se tiene poca o ninguna experiencia epidemiológica (Pfaller, 1991).

Serotipado: el tipado serológico de microorganismos está basado en la presencia o ausencia de determinantes antigénicos de superficie, somáticos, flagelares o capsulares; y su reacción con antisueros específicos (Pfaller, 1991).

El serotipado es un medio común para agrupar taxonómicamente algunas especies, su valor epidemiológico para delinear cepas dentro de especies está bien documentado y el serotipo parece ser un marcador estable. Los métodos usados para realizar el serotipado son variados e incluyen: aglutinación, coaglutinación, anticuerpos fluorescentes y pruebas de enzimo inmuno ensayo (Pfaller, 1991).

La tecnología necesaria está disponible en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, sin embargo, como herramienta epidemiológica es limitada por la pobre sensibilidad de algunos grupos de microorganismos, la falta de estandarización, la limitada disponibilidad de antisueros (Pfaller, 1991) y escasa utilidad en la identificación de cepas de brotes, ya que sólo unos pocos serotipos responden por la mayoría de los aislamientos en cada país (Tacket, 1989).

Fagotipado: La fagotipia se fundamenta en la determinación de la sensibilidad de la cepa de *Salmonella* analizada para lisarse ante una serie de bacteriófagos conocidos en diluciones apropiadas (Pfaller, 1991). Ha sido el método de elección para identificación de cepas epidémicas (Tacket, 1989).

Su utilidad epidemiológica está probada, especialmente, para *Salmonella* spp. Por ejemplo, el fagotipado de *S. typhi* (sin duda el más estudiado) y de otras

salmonelas que poseen antígeno *Vi* (*S. hirschfield* y, ocasionalmente, *S. dublin*) está basado en una serie de fagos adaptados del fago *Vi-II* de Craigie y Yen (1938). El fagotipado de *S. schottmuelleri* (Felix y Callow, 1943) y *S. typhimurium* (Anderson, 1964) usan una serie diferente de fagos.

Métodos análogos han sido propuestos para otros serotipos de *Salmonella*, algunos de ellos haciendo uso de la lisogenicidad de las cepas (Le Minor, 1984).

Las desventajas del fagotipado incluyen la falta de estandarización, pobre reproductibilidad y limitada disponibilidad, tomando en cuenta que no se han desarrollado sistemas de fagotipado para todos los serotipos. La estabilidad en el tiempo debe ser controlada cuidadosamente y el método es más bien laborioso. El tipo de bacteriófago puede ser alterado por cambios en las condiciones ambientales, número de serie de los medios del laboratorio, exposición a la luz ultravioleta o introducción de plásmidos (Pfaller, 1991). La interpretación de los resultados puede ser difícil (CDC, 1981) y sigue siendo una herramienta para laboratorios de referencia (Pfaller, 1991).

I.9.4.2. MÉTODOS GENOTÍPICOS

Los métodos genotípicos se basan directamente en el estudio del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) del microorganismo para la identificación de un clon, analizando los elementos genéticos cromosómicos y extracromosómicos (Arbeit, 1995).

A nivel de especies bacterianas hay suficiente diversidad genética para permitir la identificación de diferentes clones o grupos de clones (cepas que tienen un alto grado de relación genética) entre aislamientos de la misma especie coleccionados de diferentes fuentes y sitios en distintos momentos (Swaminathan y Matar, 1993).

Varias técnicas han sido adaptadas para su uso como métodos moleculares de tipado epidemiológico. En contraste con los métodos fenotípicos, muchas de estas técnicas son ampliamente aplicables a una gran variedad de patógenos, sin significativos cambios en los equipos, reactivos o procedimientos. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de diferenciación de la cepa a nivel genómico, de allí su poder como herramienta epidemiológica (Pfaller, 1991).

Entre ellas se encuentran: el análisis de plásmidos, el análisis con endonucleasa de restricción del ADN cromosómico y las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales se describen brevemente a continuación.

Análisis de plásmidos: El análisis del ADN plasmídico es la base de la mayoría de los estudios epidemiológicos moleculares (Mayer, 1988). Los **plásmidos** son *elementos extracromosómicos de ADN capaces de replicarse independientemente de la célula bacteriana, aunque a menudo codifican propiedades conocidas, tales como la resistencia a antimicrobianos, la capacidad invasiva, virulencia, metabolismo de carbohidratos y la producción de toxinas.*

La determinación de los perfiles plasmídicos se comenzó a usar en determinadas cepas, especialmente aquellas responsables de brotes epidémicos. Los resultados iniciales obtenidos establecieron que este método era claramente superior a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (antibiotipos), reconociéndose al perfil plasmídico como un buen marcador epidemiológico (Taylor et al., 1982; Holmberg et al., 1984; Tenover, 1995).

La mayoría de las especies bacterianas son portadoras de plásmidos, aunque ésta no es una característica universal de procariontes, el número y tamaño de los plásmidos cargados por un microorganismo es diferente de especie a especie (Tenover, 1992). En el caso de *Salmonella* el contenido de plásmidos es diverso y es frecuente que la cepa de interés no cargue plásmidos o tenga pocos (a menos que los aislamientos sean multirresistentes), siendo por tanto inútil el análisis de perfil de plásmidos (Tacket, 1989).

El análisis de perfil de plásmidos es la más simple de las técnicas moleculares, se basa en que en principio los aislamientos de una misma cepa contienen el mismo número de plásmidos, con los mismos pesos moleculares y patrones de restricción y además, son fenotípicamente similares, a juzgar por el perfil antibiótico y el biotipo (Pfaller, 1991). Por tanto, aislamientos no relacionados epidemiológicamente tendrán diferentes perfiles de plásmidos (Tacket, 1989). Cada cepa produce un perfil característico dado por sus distintos plásmidos (Pfaller, 1991).

El análisis de plásmidos está disponible en un número de laboratorios y es un método rápido de caracterización de aislamientos (Pfaller, 1991). No se debe interpretar la falta de plásmidos en un grupo de aislamientos como una indicación de similitud. En éste caso deberá usarse un método alternativo de tipado (Tenover, 1992).

A mayor número de plásmidos de diferentes tamaños, más útil es la técnica para demostrar la identidad de los aislamientos en una investigación. A mayor número de plásmidos compartidos en común de un grupo de aislamientos, más cierto es que estos aislamientos representan múltiples aislamientos de una única cepa

(Tenover, 1992). Si sólo están presentes 1 ó 2 plásmidos en el patrón, puede que no sea, suficientemente, específico para probar la identidad, ya que los plásmidos de dos cepas que por casualidad sean del mismo tamaño pueden tener secuencias de ADN completamente diferentes. En este caso se deberá recurrir a una segunda técnica más específica como, por ejemplo, el análisis con endonucleasa de restricción (Tacket, 1989).

Una **endonucleasa de restricción** es un *enzima que reconoce una secuencia de bases específica de ADN y corta a éste donde se encuentra su secuencia de reconocimiento generando fragmentos de ADN*. El número y tamaño de estos fragmentos sobre un gel de agarosa tras la electroforesis dependerá del número de sitios de reconocimiento de la enzima sobre el plásmido, reflejando la secuencia de ADN del plásmido (Tacket, 1989).

Si los plásmidos de dos cepas son del mismo tamaño y tienen fragmentos de restricción idénticos en número y tamaño, éstas se consideran iguales o muy íntimamente relacionadas. La especificidad del análisis aumenta si se estudian los patrones con dos ó más enzimas.

Por el contrario, si los plásmidos de dos cepas son de diferente tamaño, el análisis de endonucleasa puede mostrar fragmentos de restricción compartidos indicando secuencias de ADN comunes y, por lo tanto, relacionadas.

Si no hay plásmidos el análisis de restricción de endonucleasa puede aplicarse al ADN cromosómico. Fragmentos lineales de ADN son separados por electroforesis en gel y teñidos, generándose 100 ó más fragmentos, y a menos que sean comparados en detalle, pueden pasar inadvertidas diferencias sutiles en los patrones (Tacket, 1989).

Dos plásmidos diferentes no tendrán sitios idénticos de restricción a idénticos intervalos a lo largo del ADN del plásmido. La demostración que 2 o más plásmidos tienen patrones idénticos después de la digestión con 2 o más enzimas de diferentes especificaciones confirma su identidad (Pfaller, 1991).

A pesar de las ventajas del análisis de plásmidos, el uso de esta técnica tiene sus inconvenientes:

- Factores técnicos, tales como variaciones en los métodos de extracción pueden convertir una forma molecular de plásmidos en otra, o variaciones en las condiciones de electroforesis pueden influir en el perfil final
- Algunas cepas pueden perder los plásmidos de resistencia antibiótica o plásmidos secetos
- La capacidad para distinguir entre dos aislamientos disminuye, directamente, con el número de bandas presentes y con la diferencia en la disminución del tamaño molecular entre dos bandas
- La transferencia por conjugación de plásmidos entre o dentro de especies puede llevar a diferencias en los patrones plasmídicos
- El plásmido puede sufrir un rearrreglo molecular o supresión, dando como resultado un diferente tamaño molecular o patrón del fragmento de restricción. Estas diferencias pueden ser erróneamente interpretadas como cepas diferentes entre dos aislamientos (Pfaller, 1991).

Análisis con endonucleasa de restricción del ADN cromosómico: Es útil en el caso de microorganismos sin plásmidos. El genoma bacteriano puede ser analizado, a través de la comparación de los fragmentos generados in vitro por la digestión con enzimas de restricción usando el mismo principio que para el análisis de restricción de plásmidos.

El número y tamaño de los fragmentos de restricción generados por digestión de un determinado trozo de ADN están influenciados tanto por la secuencia de reconocimiento del enzima, como por la composición del ADN (Arbeit, 1995). De antemano, las cepas del mismo origen tendrán el mismo genoma y, por ello, el

mismo número y posición de los sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción (Olsen et al., 1993).

Los fragmentos de ADN pueden ser comparados directamente, tras la separación mediante electroforesis convencional en gel de agarosa (**REA: análisis con enzima de restricción**). Los resultados obtenidos con esta técnica pueden ser difíciles de reproducir y de interpretar debido al gran número de fragmentos que con frecuencia se generan.

Para simplificar la lectura de los resultados, los fragmentos de ADN a menudo son transferidos a membranas de nylon o nitrocelulosa (**Hibridización por Southern Blot**). Los fragmentos con determinadas secuencias son detectados usando sondas de ADN homólogo marcadas con P³² u otro indicador. Bajo condiciones apropiadas, la sonda empareja los fragmentos que contienen secuencias de nucleótidos idénticas o casi idénticas; produciéndose un limitado número de bandas (2-10) que facilita su interpretación y reproductibilidad. Las variaciones en el número y tamaño de los fragmentos detectados se conocen como *polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)* y reflejan las variaciones tanto del número de sitios que son homólogos a la sonda, como la localización de los sitios de restricción en o próximos a dichos sitios (Tenover, 1992; Arbeit, 1995).

Esta técnica requiere equipo adicional, es más larga, involucra más esfuerzo y, por ello, es más costosa. Puede discriminar entre cepas debido a que el cromosoma bacteriano contiene algunas regiones variables y otras que están altamente conservadas.

La mayoría de las especies bacterianas sufren mutaciones y rearrreglos en algunas regiones de sus cromosomas en el tiempo. Así, los RFLP pueden ser usados para diferenciar cepas de una especie (Tenover, 1992).

Las regiones más dinámicas, sujetas a rearrreglos y mutaciones, tendrán cambios en la secuencia de nucleótidos del cromosoma, reflejados en los patrones de

restricción cuando los fragmentos son separados por electroforesis en gel de agarosa (Pfaller, 1991; Tenover, 1992).

El ribotipado se refiere a un análisis de **Southern Blot**, en el cual las cepas son caracterizadas por los RFLP asociados a operones ribosomales (Stull et al., 1988). Los **operones** *son grupos de genes que comparten funciones relacionadas y que a menudo están regulados coordinadamente* (Arbeit, 1995).

El análisis de Southern Blot que utiliza como sonda secuencias de inserción (IS) y transposones ha demostrado ser un método reproducible y de alto poder discriminatorio para la identificación de cepas (Arbeit, 1995).

Existen enzimas que cortan el genoma bacteriano en pocos sitios producen un menor número de fragmentos de restricción pero de mayor tamaño (macrorrestricción). Estos fragmentos pueden ser separados, suficientemente, para su comparación utilizando la técnica de electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) desarrollada por Schwartz y Cantor en 1984. Es una variación de la electroforesis en gel de agarosa, donde la polaridad de la corriente a través del gel cambia, periódicamente, en lugar de mantenerse constante durante la corrida, como es el caso de la electroforesis convencional en gel de agarosa usada para el análisis con endonucleasa de restricción y la hibridización por Southern blot (Pfaller, 1991; Olsen et al, 1993).

Esta alternancia en los campos eléctricos permite separar fragmentos de ADN de alto peso molecular, ya que provoca en el ADN cambios direccionales que permiten la migración y reorientación de los fragmentos de alto peso molecular. Para este tipo de electroforesis es importante obtener el ADN lo más intacto posible, es decir, evitando al máximo las roturas de causa técnica. Para ello, se han desarrollado métodos de extracción de ADN, en los que la lisis celular se produce en bloques (insertos) cuya matriz protege las moléculas de alto peso molecular y al mismo tiempo permite la difusión de detergentes y proteasas (Arbeit, 1995).

La PFGE tiene dos importantes limitaciones, la primera es que debido a la necesidad de difusión del buffer y enzima en el inserto, la obtención de un ADN

adecuado requiere de extensos períodos de incubación que se llevan de 2-4 días (Maslow, et al., 1993). Este esfuerzo es, parcialmente, recompensado por el hecho de que el ADN en agarosa es estable, por años, si se conserva a 4°C y puede ser liberado en soluciones para su uso en otros protocolos. La segunda, es que PFGE requiere un equipamiento relativamente caro y especializado (Birren y Lai, 1993).

Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La característica esencial de la PCR es la capacidad de replicar rápida y exponencialmente (amplificar) una secuencia particular de ADN (el molde). El procedimiento básico involucra diferentes componentes:

- El *molde* que representa un pequeño fragmento de ADN, frecuentemente de entre 0,5 y 2 kb, debido que secuencias blanco de mayor tamaño son difíciles de amplificar eficientemente
- Dos pequeños oligonucleótidos iniciadores (*primers*) correspondientes a secuencias terminales opuestas del molde, definen los lugares en los que se iniciará la replicación
- Una rápida reacción en cadena que es llevada a cabo mediante el uso de una polimerasa termoestable y un termociclador programable. Un procedimiento completo, consistente en 20 a 30 ciclos, puede conducirse en un pequeño tubo de microcentrifuga y en pocas horas generará suficiente producto (amplicon) para ser visualizado y medido directamente en un gel de poliacrilamida o de agarosa (Arbeit, 1995).

Se han desarrollado diversas variaciones de ésta técnica para proveer de adecuada información adicional para el tipado de cepas, entre ellas: *la digestión por restricción de los productos de la PCR*, usando una endonucleasa de restricción y analizando los fragmentos de restricción resultantes en polimorfismos mediante electroforesis. *La rep-PCR* basada en secuencias repetitivas del cromosoma, *la PCR con iniciadores arbitrarios* basada en el hecho de que pequeños iniciadores (10 kb) cuyas secuencias no están dirigidas, directamente, a algún locus específico

hibridizarán con suficiente afinidad en sitios aleatorios del cromosoma para permitir la iniciación de la polimerización (Arbeit, 1995).

Las principales ventajas de estas técnicas incluyen su flexibilidad, simplicidad, disponibilidad de equipo y reactivos y rápida puesta en marcha. Sus problemas críticos se refieren a la optimización de los protocolos y la elección de los reactivos, la reproductibilidad entre corridas y entre diferentes laboratorios, la interpretación de los patrones y criterios de diferenciación usadas para la delineación de un clon (Struelens et al., 1996).

I.9.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE TIPADO MOLECULAR.

Los criterios de interpretación de los polimorfismos genómicos en estudios epidemiológicos de agentes microbianos patógenos varían de acuerdo con el propósito del estudio, por ejemplo, si se trata de la investigación de un brote o de un proyecto de vigilancia a gran escala. Hay varios criterios de índole general, recogidos por consenso de los miembros del grupo europeo de marcadores epidemiológicos de la sociedad europea de microbiología clínica y enfermedades infecciosas (Struelens et al., 1996), relacionadas con el análisis cuantitativo del polimorfismo genómico microbiano con fines epidemiológicos. Estos pueden resumirse como sigue:

1) Un clon es un grupo de organismos genéticamente idénticos descendientes de un único antecesor común.

2) Ningún método de tipado confirma que el genoma entero de dos organismos es idéntico.

3) Se acepta que cerca de 30 sitios genómicos son necesarios para estimar de forma fidedigna la estructura de un clon, aunque este número puede variar dependiendo de la diversidad del locus. De manera grosera, esto equivale al mismo número de bandas de ADN en patrones de restricción o amplificación que deben ser analizadas para estimar, adecuadamente, la diversidad genómica.

4) La relación entre cepas es inferida mediante los métodos de tipificación basados en el tamaño del ADN tras la separación por electroforesis, bien en términos de número de bandas diferentes o, bien en el porcentaje de similitud de los patrones de bandas (Coeficiente de Dice).

5) Para métodos muy discriminativos capaces de distinguir, consistentemente, aislamientos epidemiológicamente no relacionados, la observación de que dos

aislamientos representan el mismo tipo sugiere, firmemente, que ambos están genética y epidemiológicamente relacionados.

6) La interpretación de los resultados de tipado es más difícil cuando los aislamientos son similares, es decir, cuando difieren tan sólo en uno ó en pocas de las numerosas características analizadas.

7) Los aislamientos que difieren pero no lo suficiente como para ser designados como un distinto tipo, normalmente, son denominados subtipos del tipo más parecido.

8) Los aislamientos cuyos perfiles de tipado son indistinguibles se notifican como aislamientos múltiples de una única cepa. Frecuentemente, el perfil de tipado más común (o modal) detectado en un grupo de aislamientos es considerado representante de la cepa de un brote.

9) Aislamientos cuyos perfiles de tipado difieren de este patrón modal por un evento genético (cambio de 2-3 bandas) son considerados genéticamente “*muy relacionados*” y probablemente, parte del brote con fines clínicos y epidemiológicos.

10) Los aislamientos cuyos perfiles difieren del patrón modal en dos eventos genéticos (cambios de 4-6 bandas) se consideran “*posiblemente relacionados*” genéticamente y posiblemente, parte del brote.

11) Aislamientos cuyos perfiles difieren en 3 ó más eventos genéticos (más de 7 bandas) son considerados “diferentes” y no forman parte del brote.

12) La decisión final acerca de sí incluirle en “*muy relacionado o posiblemente relacionado*” en la definición epidemiológica del brote vendrá dada por la integración del análisis molecular y clínico (Arbeit, 1995; Struelens et al., 1996).

13) En general, la similitud del patrón genómico no puede ser considerada como la medida exacta de la distancia genética, debido a que la posición de las bandas no es independiente, un único punto de mutación puede producir hasta tres diferencias en las bandas en el patrón de restricción del ADN, si está asociado con la creación o eliminación de un sitio de restricción. Sin embargo, en ciertas condiciones, el patrón de macrorrestricción genómica puede ser utilizado para especies y subespecies como medida de relación genética (Struelens et al., 1996).

I.9.6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA *SALMONELLA*.

La epidemiología molecular de la *Salmonella* es la aplicación de las técnicas de genética molecular para la tipificación de cepas de *Salmonella* con fines epidemiológicos. La sensibilidad y especificidad de los sistemas de tipificación usando técnicas de genética molecular son tales que pueden ser utilizadas para probar hipótesis, que no pueden probarse fácilmente por la epidemiología tradicional u otras técnicas de laboratorio.

Se han aplicado a la investigación de *Salmonella* de una fuente común, confirmando por ejemplo, la importancia de la diseminación de salmonelas desde los animales al hombre, y han sido aplicadas a estudios de la transmisión de la resistencia antimicrobiana en la *Salmonella*.

Epidemiológicamente, es importante la tipificación de *Salmonella* debido a que permite asociar un caso con otro, y asociación de casos con alimento u otros vehículos, animales, área geográfica o período de tiempo. El tipado molecular de *Salmonella* está basado en el contenido de ADN del organismo (utilizado para la identificación de un clon), más que en las características fenotípicas, tales como el biotipo o fagotipo.

La Tabla 7 presenta un resumen de diversas publicaciones en las que se han empleado las técnicas moleculares en el estudio epidemiológico de cepas de *Salmonella*.

Tabla 7. Aplicaciones de la epidemiología molecular en el estudio de las salmonelas no typhi.

<i>Aplicación</i>	Método	Autor (es)
Investigación de brote	PP	Taylor et al., 1981
Estudio casos-contrroles Serotipo: Munchen Vehículo: marihuana		
Investigación de brote Serotipo: Newport Vehículo: carne de vacuno	PP	Riley et al., 1983
Investigación de brote Serotipo: Goaldcoast Vehículo: Paté francés	PP	Threlfall et al., 1986
Estudio de resistencia a antimicrobianos Serotipo: Enteritidis Vehículo: leche cruda	PP	Tacket et al., 1985
Estudio de resistencia a antimicrobianos, Brote de infección nosocomial Serotipo: Wien	PP	Casalino et al., 1984
Estudio de resistencia a antimicrobianos, Trasmisión animal hombre Serotipo: Newport	PP	Spika et al., 1987
Estudio de resistencia a antimicrobianos Origen: animal y humano Serotipo:Typhimurium	PP	O'Brien et al., 1982
Estudio de la repercusión de antimicrobianos en alimentos para animales Serotipo: Newport Animal: vacuno	PP	Holmberg et al., 1984
Diferenciación de cepas Serotipo: Muenster	PP	Benzanson et al., 1983
Diferenciación de cepas Origen animal Serotipo: Typhimurium	PP	Nakamura et al., 1986
Diferenciación de cepas		

Origen clínico y bovino Serotipo: Dublin	PP	Olsen et al., 1990
Diferenciación de cepas Origen avícola Serotipo: Berta	PP	Sorensen et al., 1991
Diferenciación de cepas Origen animal Serotipo: Gallinarum	PP	Christensen et al., 1992
Diferenciación de cepas Origen clínico Serotipo: Dublin	PP	Ferris et al., 1992
Diferenciación de cepas Serotipo: Enteritidis	PP	Rivera et al., 1991 Morris et al., 1992 Brown et al., 1993 Nair et al., 1995
Vigilancia Epidemiológica Serotipo: Enteritidis FT 4	PP	Threlfall et al., 1994
Diferenciación de fagotipos Investigación de brote Serotipo: Typhimurium	PP	Threlfall et al., 1990
Diferenciación de cepas, brote Serotipo: Typhimurium Vehículo: chocolate	REA	Kapperud et al., 1989
Investigación de brote, identificación de fuente Serotipo: Enteritidis Vehículo: huevo	REA	Dorn et al., 1993
Identificación de expansión clonal de fagotipos Serotipo: Enteritidis	PFGE	Bauttsh, 1993
Identificación de fuentes comunes de brotes Serotipos: Bovismorbificans y Stanley	PFGE	Puohiemi et al., 1997
Investigación de brote Asociación alimento y manipulador Serotipo: Javiana	PFGE	Roger et al., 1998
Diferenciación casos esporádicos y brotes Serotipo: Enteritidis	PFGE	Suzuki et al., 1996

Investigación de brote Serotipo: Enteritidis	PFGE	González-Hevia et al., 1994 Murase et al., 1996 Thong et al., 1998
Diferenciación de cepas Serotipo: Enteritidis	Southern Hidridización	Usera et al., 1994
Diferenciación de cepas Serotipos: Reading, Seftenberg y Typhimurium	Ribotipado	Esteban et al., 1993
Investigación de brote Serotipo: Enteritidis	Ribotipado	Gruner et al., 1994
Diferenciación de cepas Serotipo: Enteritidis	Ribotipado	González-Hevia y Mendoza, 1995 Liebisch y Schwarz, 1996 Landeras et al., 1996
Diferenciación de fagotipos Serotipo: Enteritidis y Typhimurium	Ribotipado PFGE	Powell et al., 1995 Baggesen et al., 1997
Diferenciación de cepas Serotipos: Varios	PCR	Lagatolla et al., 1996
Determinación de cambios genotípicos Serotipo: Enteritidis Origen: pollos	PCR , primers arbitrarios	Fadl y Khan, 1997
Detección de Salmonella en alimentos Serotipo: Typhimurium	PCR , primers arbitrarios	Miyamoto et al., 1998
Detección de Salmonella en alimentos	PCR	Gouws et al., 1998 Bailey, 1998

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. INTRODUCCIÓN

Según datos del año 1997 de la Consejería de Agricultura la producción local de pollos alcanzó la cifra de 10.698.730 Kg por año en Canarias, exportándose aproximadamente la mitad. Por tanto, el consumo de pollos de producción local en Canarias fue de 5.577.730 Kg.

Por otra parte, estadísticas de la Cámara de Comercio indican que, para el mismo año, se recibieron 31.019.011 Kg de carne de pollo importada en diferentes presentaciones y procedentes de diversos países (americanos, europeos y asiáticos). Pollo entero congelado, pollo troceado congelado, pollo entero fresco o refrigerado y pollo troceado fresco o refrigerado fueron las presentaciones comerciales llegadas a la Comunidad Autónoma de Canarias (Tabla 8).

En 1997 Canarias importó carne de pollo principalmente de Brasil (70%), Países Bajos (11,4%), Francia (9,5%), y Estados Unidos (5,6%). De Brasil y Países Bajos se recibieron, fundamentalmente, pollo entero y troceado congelado, de Francia sólo pollo entero congelado y de los Estados Unidos sólo pollo troceado congelado.

Tabla 8. Origen de la carne de pollo importada consumida en la Comunidad Autónoma de Canarias en 1997

Presentación	Origen	Cantidad (Kg)	%
Pollo entero fresco	Reino Unido	654	0,002
Pollo entero congelado	Francia	2.936.244	9,5
	Brasil	2.732.648	8,80
	Países Bajos	2.508.571	8,08
	Bélg-Luxem	262.490	0,84
	Austria	18.510	0,05
	Hungría	6.000	0,02
	Reino Unido	104	0,0003
Pollo troceado fresco	Reino Unido	1.625	0,005
Pollo troceado congelado	Brasil	18.972.776	61,2
	EEUU	1.750.244	5,64
	Países Bajos	1.029.654	3,31
	Irlanda	429.681	1,38
	Bélg-Luxem.	317.510	1,02
	Reino Unido	23.795	0,07
	Tailandia	16.615	0,05
	Hungría	13.892	0,04
TOTAL		31.019.011	100%

II.2. MUESTRAS ENSAYADAS

En este estudio se analizan muestras correspondientes a pollos enteros procedentes de Francia y Brasil, pechugas de Brasil y muslos de Brasil y Estados Unidos, siendo éstas recogidas en un período de tiempo de 18 meses comprendidos entre Junio de 1.996 y Diciembre de 1.997.

Se ha mantenido la proporción de las muestras analizadas relacionadas con la cantidad de kilogramos de carne de pollo importada. No se ensayaron muestras procedentes de Países Bajos debido a que éstas fueron distribuidas principalmente en la Provincia de Las Palmas de Gran Canaria.

En total se ensayaron 406 muestras, 170 muslos, 121 pechugas y 115 enteros (Tabla 9). Las presentaciones comerciales de pollo para el consumo humano pueden venir con o sin piel. Hemos considerado como *unidad analítica* de cada muestra, las dos partes a analizar (piel y músculo). El total de unidades analíticas estudiadas fue de 691 (Tabla 10).

La distribución de las muestras según país de procedencia y tipo de muestra se refleja en la Tabla 11.

Tabla 9. Distribución absoluta y porcentual del total de muestras ensayadas

Tipo de Muestra	Nº	%
Muslos	170	41,9
Pechugas	121	29,8
Enteros	115	28,3
Total	406	100,0

Tabla 10. Distribución absoluta del total de unidades analíticas ensayadas según tipo de muestra

Tipo de Muestra	Piel	Músculo	Total
Muslos	170	170	340
Pechugas	0	121	121
Enteros	115	115	230
Total	285	406	691

Tabla 11. Distribución absoluta del total de muestras ensayadas según país

Tipo de Muestra	Brasil	Francia	EEUU	Total
Muslos	143	0	27	170
Pechugas	121	0	0	121
Enteros	39	76	0	115
Total	303	76	27	691

II.3. RECOGIDA DE MUESTRAS

Como la finalidad del muestreo en microbiología alimentaria es obtener una muestra representativa del alimento para su análisis y concebir resultados fiables sobre su estado higiénico sanitario, es necesario que el producto, en el momento de su análisis, reúna las mismas condiciones microbiológicas que tenía al realizar el muestreo. La recolección se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia y con material estéril.

Esta operación fue llevada a cabo por el personal de veterinarios adscritos a la Dirección General de Salud Pública del Servicio Canario de Salud en la isla de Tenerife.

Una vez tomadas las muestras fueron enumeradas y etiquetadas correctamente, transportándolas en el menor tiempo posible, en nevera hasta el laboratorio de microbiología alimentaria del Área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de La Laguna, manteniéndolas congeladas (-10 °C) hasta su análisis.

II.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Al ser todas congeladas, la preparación de las muestras para el análisis, se inicia con su descongelación en nevera (4° C) durante toda la noche.

La piel se separa mediante una incisión aséptica con bisturí, quemando posteriormente la superficie de la carne expuesta para obtener, con un nuevo bisturí estéril, la porción de músculo. En balanza electrónica (Cobos Precisión M-150) se pesan 25 g de cada unidad analítica de la presentación, colocándose en bolsas plásticas individuales estériles.

II.5. MÉTODO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

La sistemática analítica para el aislamiento e identificación de microorganismos del género *Salmonella* en los alimentos utiliza el esquema propuesto por Edel y Kampelmacher en el año 1969 y recogido por las normas nacionales e internacionales.

- Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo (18 horas)
 - Enriquecimiento en medios líquidos selectivos (24-48 horas)
 - Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos (24-48 horas)
- Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas
- Confirmación serológica de las colonias sospechosas

En este estudio se han seguido las normas recomendadas por el Centro Nacional de Nutrición (Pascual, 1992) y por Mossel y Moreno (1985).

II.5.1. PRE-ENRIQUECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO NO SELECTIVO

En esta etapa se busca revivir las salmonelas lesionadas, incrementar su vitalidad, proporcionándoles las condiciones fisiológicas adecuadas para su perfecto desarrollo.

El medio elegido es el agua de peptona tamponada que, al mantener un pH constante, favorece el desarrollo de *Salmonella*, además que la peptona y los fosfatos la revitalizan.

Una vez pesados los 25 g de muestra, se añade agua de peptona tamponada (225 ml) a la bolsa plástica, obteniéndose una solución 1:10. Luego se coloca convenientemente esta mezcla en el “Stomacher” (Colworth Lab Blender 400), donde es triturada mecánicamente, con las dos paletas situadas en el interior del mismo, durante dos minutos.

Con esta maniobra se consigue disgregar la piel o el músculo del pollo y se contribuye a poner en suspensión a los microorganismos. La mezcla homogeneizada es incubada a 37° C durante 18 horas (solución madre).

II.5.1.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL AGUA DE PEPTONA TAMPONADA (BUFFERED PEPTONE WATER, CM509 OXOID)

Peptona.....	10 g
Cloruro de Sodio.....	5 g
Fosfato disódico.....	3,5 g
Fosfato monopotásico.....	1,5 g
Agua destilada.....	1000 ml
pH 7.2 ± 0.2	

Se disuelve por calentamiento y se dispensa en matraces Erlenmeyer de 500 ml a razón de 225 ml, esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Es un medio de pre-enriquecimiento para ser usado antes del medio de enriquecimiento para el aislamiento de especies de *Salmonella* a partir de alimentos. Favorece la resuscitación de las células que han sido dañadas por los procesos de preservación de los alimentos.

II.5.2. ENRIQUECIMIENTO EN MEDIOS LÍQUIDOS SELECTIVOS

En esta fase se trata de estimular y favorecer el crecimiento de las salmonelas al tiempo que se restringe la proliferación de la flora competitiva. Esto se lleva a cabo transfiriendo 0,1 ml de la solución madre antes preparada, al caldo de Rappaport-Vassiliadis e incubando a 42° C, temperatura ideal para la recuperación de *Salmonella*, durante 24-48 horas.

El medio Rappaport-Vassiliadis contiene verde malaquita responsable de inhibir el crecimiento de la flora competitiva, pero no de *Salmonella*. Los fosfatos monopotásico y dipotásico mantienen el pH constante y la concentración de cloruro magnésico es óptima para lograr un buen enriquecimiento del caldo y favorecer el desarrollo de *Salmonella*.

II.5.2.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO RAPPAPORT-VASSILIADIS (RAPPAPORT-VASSILIADIS ENRICHMENT BROTH, CM669 OXOID)

Peptona de Soja.....	5 g
Cloruro de Sodio.....	8 g
Fosfato monopotásico.....	1,6 g
Cloruro de Magnesio.....	40 g
Verde de Malaquita.....	0,04 g
Agua destilada.....	1000 ml
pH 5.5 ± 0.2	

Las cantidades dadas para la fórmula clásica hacen 110 ml de medio. Siguiendo las instrucciones del manual OXOID, se pesan 30 g (peso equivalente del medio deshidratado por litro) y se añaden 1000 ml de agua destilada, repartiéndolo en botellas o tubos de tapón de rosca en volúmenes de 10 ml y esterilizamos en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

Este medio está basado en una formulación aportada por Van Schothorst y Renaud (1983) y ha sido recomendado como medio de enriquecimiento selectivo cuando se pretende aislar *Salmonella* a partir de alimentos y muestras ambientales.

También puede usarse para aislar *Salmonella* en muestras de heces humanas sin pre-enriquecimiento, pero tomando en cuenta que el inóculo deberá ser pequeño. La formulación original descrita por Rappaport y colaboradores en 1956 fue, específicamente, diseñada para explotar cuatro características de las especies de *Salmonella* cuando se comparan con otras *Enterobacteriaceae*:

- 1.- La capacidad de sobrevivir a presiones osmóticas relativamente altas.
- 2.- La multiplicación a niveles de pH relativamente bajos.
- 3.- El ser relativamente más resistentes al verde malaquita.
- 4.- El tener requerimientos nutritivos relativamente menores.

El Rappaport-Vassiliadis es superior que el caldo de selenito y el de tetrionato para el enriquecimiento de *Salmonella* (con excepción de *S. typhi*). Vassiliadis y colaboradores modificaron el caldo de Rappaport disminuyendo la concentración de verde malaquita y aumentando la temperatura de incubación a 43°C. Esta modificación es el medio Rappaport-Vassiliadis que ha demostrado ser superior a otros medios de enriquecimiento selectivo para *Salmonella*, especialmente cuando se usa un pequeño inóculo (Vassiliadis et al., 1976).

El caldo de Rappaport-Vassiliadis de OXOID es similar al descrito por Vassiliadis y colaboradores, sólo que la peptona usada es peptona de soja, que favorece el crecimiento de *Salmonella*.

Es importante que el tamaño del inóculo usado sea suficientemente pequeño para no interferir con la selectividad del medio. Las proporciones inóculo/caldo recomendadas están entre 1:100 y 1:2000.

II.5.3. AISLAMIENTO DIFERENCIAL SOBRE MEDIOS SÓLIDOS SELECTIVOS

Se restringe, aún más, el crecimiento de la flora competitiva y se estimula el de *Salmonella*. La composición de los medios seleccionados permite el crecimiento de colonias con aspecto característico en cada uno de ellos:

A partir del cultivo obtenido en el medio de Rappaport-Vassiliadis, se siembra por duplicado y sin recargar el asa en la segunda placa, sobre agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD, OXOID) y agar *Salmonella-Shigella* (S-S, OXOID) e incubamos en estufa a 37° C, durante 24-48 horas.

Las colonias de *Salmonella* crecidas sobre XLD son rojas con centros negros debido a un cambio en el pH por fermentación de la xilosa y descarboxilación de la lisina. A veces no se forman centros negros o, por el contrario, las colonias son negras casi por completo. Los centros negros se deben a la producción de H₂S. Las colonias de *Salmonella* crecidas sobre S-S muestran un centro negro rodeado de un borde claro.

II.5.3.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL AGAR SALMONELLA SHIGELLA (SALMONELLA SHIGELLA AGAR, SS AGAR, CM99 OXOID)

Polvo `Lab-Lenco`	5 g
Peptona.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sales Biliares.....	8,5 g

Citrato de Sodio.....	10 g
Tiosulfato de Sodio.....	8,5 g
Citrato férrico.....	1 g
Verde brillante.....	0.00033 g
Rojo neutro.....	0,025 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml
pH 7.0 ± 0.2	

Se disuelve por calentamiento hasta hervir, agitando suave y frecuentemente. No se lleva al autoclave. Se deja enfriar a 50°C en un baño y se dispensa a placas de Petri estériles.

Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella* y algunas especies de *Shigella* a partir de muestras clínicas, alimentos, etc. Los microorganismos gram-positivos y coliformes son inhibidos debido a la acción de los componentes inhibitorios selectivos, es decir, del verde brillante, sales biliares, tiosulfato y citrato.

El tiosulfato en combinación con el hierro actúa también como un indicador de la producción de sulfito, lo que observamos en el ennegrecimiento de los centros de las colonias.

II.5.3.2. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL AGAR XILOSA-LISINA-DESOXICOLATO (XLD MEDIUM, CM469 OXOID)

Extracto de levadura en lvo.....	3 g
Clorhidrato de L-lisina.....	5 g
Xilosa.....	3,75 g
Lactosa.....	7,5 g
Sacarosa.....	7,5 g

Desoxicolato de Sodio.....	1 g
Cloruro de Sodio.....	5 g
Tiosulfato de Sodio.....	6,8 g
Citrato férrico amónico.....	0,8 g
Rojo fenol.....	0,08 g
Agar.....	25,5 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH 7.4 ± 0.2

Se disuelve por calentamiento suave hasta ebullición con agitación frecuente, ajustando el pH a 6,9. Luego enfriamos a 50°C en un baño y distribuimos en placas a razón de 15 ml. No se debe preparar demasiada cantidad del medio para no tener que prolongar el tiempo de calentamiento. No es requiere esterilización en autoclave.

Este medio fue originalmente formulado por Taylor (1965) para el aislamiento de *Shigella* en muestras de heces. Desde entonces ha sido un medio satisfactorio para el aislamiento e identificación presuntiva tanto de *Salmonellae* como de *Shigellae*.

Se basa en la fermentación de la xilosa, descarboxilación de la lisina y producción de sulfuro de hidrógeno para la diferenciación primaria de *Shigella* y *Salmonella* de bacterias no patógenas.

La rápida fermentación de la xilosa es casi universal en las Enterobacterias, excepto para los miembros de los géneros *Shigella*, *Providencia* y *Edwardsiella*. Por ello, la presencia de xilosa en el medio es para que las especies de *Shigella* puedan ser identificadas por una reacción negativa. Las especies de *Salmonella* son diferenciadas de los fermentadores de xilosa no patógenos debido a la incorporación de la lisina en el medio. Las salmonelas agotan la xilosa y descarboxilan la lisina, alterando en consecuencia el pH. La presencia de especies de *Salmonella* y *Edwardsiella* se diferencian de la presencia de *Shigellae* por un indicador de sulfuro de hidrógeno.

La alta acidez producida por fermentación de la lactosa y sucrosa, evita que los coliformes lisina positivos cambien el pH a un valor alcalino y que los productores no patógenos de sulfuro de hidrógeno descarboxilen la lisina. La acidez también permite prevenir el ennegrecimiento de estos microorganismos por un período de igual o superior de 18-24 horas de la búsqueda de patógenos.

El desoxicolato de sodio actúa en el medio como un inhibidor. La concentración usada permite la inhibición de los coliformes, sin disminuir la capacidad para mantener a *Salmonellae* y *Shigellae*.

II.5.4. CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS COLONIAS SOSPECHOSAS

A partir del medio sólido se toman dos o más colonias presuntivas de *Salmonella* y se inoculan los tubos de agar triple azúcar hierro inclinado (KIA; TIA). Se inocula el medio mediante la siembra en estría, atrás y adelante en la superficie inclinada y a continuación, por picadura en la columna de agar e incubamos por 24 horas a 37°C.

Los cultivos sospechosos de ser *Salmonella* muestran en agar triple azúcar hierro las partes inclinadas alcalinas (color rojo) y las columnas de medio ácidas (color amarillo), con o sin producción de gas y ennegrecimiento por presencia de sulfuro de hidrógeno. Esta reacción indica que el organismo fermenta la glucosa (columna amarilla) pero que no fermenta ni la lactosa ni la sacarosa (parte inclinada roja), reacciones típicas de las salmonelas. Sin embargo, algunas salmonelas pueden fermentar la sacarosa o la lactosa y producir acidez (color amarillo) tanto en la parte inclinada como en la columna del medio.

En caldo de urea sembramos abundantemente, en este caldo la *Salmonella* al carecer de ureasa no hidroliza la urea y por lo tanto, no hay producción de amoníaco ni cambio de color del indicador.

II.5.4.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL AGAR HIERRO DE KLIGLER (KIA, KLIGER IRON AGAR, CM33 OXOID)

Polvo 'Lab Lenco'	3 g
Extracto de levadura.....	3 g
Peptona.....	20 g
Cloruro de Sodio.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Glucosa.....	1 g
Citrato férrico.....	0,3 g
Tiosulfato de Sodio.....	0,3 g
Rojo Fenol.....	0,05 g
Agar.....	12 g
Agua destilada.....	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

Se disuelve por calentamiento y se reparte a razón de 7 ml, aproximadamente, en tubos de 160 x 16 mm, esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se deja solidificar en posición inclinada, de tal forma que se obtenga un fondo de 3-5 cm. El medio se debe utilizar dentro de los 5-6 días que siguen a su preparación.

Es un medio diferencial para la identificación de *Enterobacteriaceae* basado en la fermentación de los azúcares y la producción de sulfuro de hidrógeno. El citrato férrico se utiliza como indicador para detectar la producción de dicho sulfuro de hidrógeno.

II.5.4.2. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE LA BASE DE CALDO UREA DE CHRISTENSEN (UREA BROTH BASE CM71 OXOID)

Peptona.....	1 g
Glucosa.....	1 g
Fosfato disódico.....	1,2 g

Fosfato deshidrogenado de potasio.....	0,8 g
Cloruro de Sodio.....	5,0 g
Rojo Fenol.....	0,004 g
Agua destilada	1000 ml

pH $6,8 \pm 0,2$

Se añaden 0,9 g de medio a 95 ml de agua destilada, disolvemos y esterilizamos en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Luego se deja enfriar a 55°C e introducimos asépticamente 5 ml de una solución de urea estéril al 40% (Urea 40% SR20 OXOID). Mezclamos bien y distribuimos en cantidades de 10 ml en tubos estériles.

Es una modificación en líquido del medio de Christensen (Maslen, 1952). La modificación es útil para la diferenciación de microorganismos productores de ureasa miembros de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, durante el análisis rutinario de hisopados rectales y heces. Las ventajas de este medio líquido son que:

- 1.-Puede usarse una pipeta Pasteur para inocular otro medio de diagnóstico.
- 2.-Se produce un crecimiento rápido que posibilita detectar una clara reacción positiva tras de 2 a 5 horas de incubación a 35°C.
- 3.-Fácil determinación de contaminación durante el almacenamiento.

II.5.5. TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN

Se utiliza una prueba rápida de microaglutinación al látex (MicroScreen Latex Slide Agglutination. Microgen Bioproducts) para la identificación presuntiva de *Salmonella* en medios de cultivo selectivos y diferenciales. La investigación de salmonelas en cultivos es particularmente adecuada debido al alto valor predictivo de un resultado negativo.

Principios de la prueba:

Consiste en un preparado de antisueros polivalentes contra un amplio rango de antígenos flagelares de *Salmonella* que es usado para cubrir partículas de látex. Cuando se mezcla con una suspensión de *Salmonella* que contenga estos antígenos, las partículas de látex aglutinan rápidamente formando grumos visibles.

Para evitar reacciones cruzadas con otras *Enterobacteriaceae*, los anticuerpos contra los principales antígenos somáticos son eliminados durante la preparación del antisuero. Consecuentemente, la reacción predominante es la de los antígenos flagelares, aunque el reactivo reaccionará también con especies no móviles como *S. pullorum* y *S. gallinarum*.

Tras la mezcla del reactivo con una suspensión de la colonia sospechosa en una gota de solución salina isotónica, la presencia de aglutinación en los dos primeros minutos, es un resultado positivo y es indicativo de la presencia de *Salmonella* en la muestra.

II.5.6. PREPARACIÓN DEL PANEL E IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA*

Una vez realizada la prueba rápida de micro-aglutinación al látex, para la identificación presuntiva de Salmonella, se procede a la identificación bioquímica y estudio de la resistencia a los antimicrobianos de los aislados mediante el MicroScan WalkAway-96, de Baxter Laboratories, usando el panel para microorganismos gram-negativos (Panel Combo Neg BP tipo 2I).

Preparación del inculo.

Se utilizó la técnica del patrón de turbidez. Mediante un aplicador estéril o un asa bacteriológica se tomaron de 4-5 colonias grandes o 5-10 pequeñas, bien aisladas y morfológicamente similares, en un cultivo de 18-24 horas, emulsionando las colonias en 3 ml de agua para inculo (agua destilada esterilizada). La turbidez final debe ser equivalente a 0,5 McFarland del patrón de turbidez de sulfato de bario. Se cierra bien el tubo y se agita 2-3 segundos. Luego, se traspasa con pipeta 0,1 ml (100 µl) de la suspensión estandarizada a 25 ml de agua para inculo con Pluronic-D. Cerramos bien e invertimos 8-10 veces para mezclar. También se puede utilizar el sistema PROMPT.

Rehidratación del Panel.

Se realiza la rehidratación/inoculación del panel mediante el sistema RENOK de MicroScan con inoculadores B1013-4, obteniéndose en los pocillos una concentración final de $4-7 \times 10^5$ CFU/ml.

Con la ayuda de un cuentagotas, recubrimos los pocillos con los substratos glucosa, urea, sulfuro de hidrógeno, arginina, ornitina y base descarboxilasa con 3 gotas de aceite mineral.

Incubación y lectura.

Se coloca la tapa limpia encima del panel para evitar la evaporación e incubamos en el interior del Walk-away a 35° C durante 15-24 horas en ambiente sin CO₂. La lectura de las pruebas bioquímicas y de la sensibilidad a antibióticos es automática.

II.5.6.1. FUNDAMENTOS DE IDENTIFICACIÓN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Fermentación de carbohidratos: La fermentación de un carbohidrato específico da lugar a la formación de ácido y al descenso del pH que se detecta mediante el indicador Rojo Fenol. Las salmonelas degradan fermentativamente la glucosa, manitol, sorbitol y maltosa. Mientras que son sacarosa y lactosa negativas.

Urea: El enzima ureasa actúa sobre la urea formando amoníaco. El aumento de pH es detectado mediante el indicador rojo fenol. Las salmonelas no hidrolizan la urea, por tanto son urea negativa.

Sulfuro de Hidrógeno (H₂S): A partir de tiosulfato de sodio se produce sulfuro de hidrógeno gaseoso que reacciona con los iones férricos del medio para producir un precipitado negro. Las salmonelas son H₂S (+).

Indol: El metabolismo del triptófano da lugar a la formación de indol, que se detecta por la adicción del reactivo de Kovac. Si se produce indol se desarrolla un color rojo. Las salmonelas no producen indol, por tanto son indol (-).

Lisina: La descarboxilación de este aminoácido da lugar a la formación de aminas básicas detectadas por el indicador púrpura de bromocresol (reacción alcalina). Las salmonelas, por lo general, descarboxilan la lisina (lisina +).

Triptófano desaminasa: Las bacterias capaces de desaminar el triptófano producen ácido indol pirúvico que reacciona con los productos hidrolíticos para formar un precipitado negro. Las salmonelas no son capaces de desaminar el triptófano.

Voges-Proskauer: A partir del piruvato sódico se produce acetoína, indicado por la aparición de color rojo al añadir KOH al 40% y alfa naftol al 5%. Las salmonelas no producen acetoína, por lo que la reacción de Voges-Proskauer es negativa.

Betagalactosidasa: La betagalactosidasa hidroliza el orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido que libera el orto-nitrofenol de color amarillo. Las salmonelas no producen betagalactosidasa, por tanto son ONPG (-).

Citrato: La utilización de éste sustrato como única fuente de carbono para el metabolismo da lugar a un aumento del pH que es detectado por el indicador azul de bromotimol. Las salmonelas son citrato (+).

Nitrato: Se detecta la capacidad de un organismo para reducir el nitrato a nitrito añadiendo N,N-Dimetil-alfa-naftilamina y ácido sulfanílico, produciéndose un color rojo en presencia de nitrito. Las salmonelas reducen los nitratos a nitrito.

II.5.6.2. FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Para el panel Combo Neg. BP 2I las concentraciones de antibióticos utilizadas, son las equivalentes a los puntos de ruptura por categorías del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La sensibilidad se registra basándose en la inhibición de un organismo a baja y alta concentración ante un agente antimicrobiano. La inhibición del crecimiento en ambas se define como Sensible (S). La inhibición del crecimiento sólo en la concentración mayor se define como Moderadamente Sensible (MS) o Intermedia (I). Crecimiento en ambas concentraciones, alta y baja, se define como Resistente (R) (Manual BAXTER Gram-negativos). Sin embargo, a efectos de facilitar el análisis de los resultados en este estudio se han considerado tan solo las dos categorías esenciales, es decir Sensible y Resistente (que engloba a los aislados Resistentes, Moderadamente Sensibles o de Sensibilidad Intermedia).

Estas pruebas son una miniaturización de las pruebas de sensibilidad realizadas por el método de la dilución en tubo. Se diluyen seriadamente diversos agentes antimicrobianos en caldo Mueller-Hinton suplementado con Calcio y Magnesio, a fin de obtener aquellas concentraciones de interés. Los pocillos de Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol) contienen timidín-fosforilasa para reducir los niveles de timidina en el medio.

Después de inocular una solución estandarizada de microorganismos e incubar durante 15 horas a 35°C, se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) observando la concentración más baja de cada antimicrobiano que muestra inhibición del crecimiento.

Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: Amikacina (Ak), Amoxicilina/Clavulánico (Aug), Ampicilina (Am), Aztreonam (Az), Cefazolina (Cfz), Cloramfenicol (C), Ciprofloxacina (Cp), Cotrimoxazol (T/S), Gentamicina (Gm), Imipenem (Imp), Ofloxacina (Of), Piperacilina (Pi), Tetraciclina (Te) y

Tobramicina (To). Las concentraciones probadas para cada antibiótico se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 12. Concentraciones de los antimicrobianos ensayados

Antibióticos	Concentración mínima	Concentración máxima
Amikacina (Ak)	16	32
Amoxicilina/clavulánico (Aug)	8/4	16/8
Ampicilina (Am)	8	16
Aztreonam (Az)	8	16
Cefazolina (Cfz)	8	16
Cloramfenicol (C)	8	16
Ciprofloxacina (Cp)	1	2
Cotrimoxazol (T/S)	2/38	-
Gentamicina (Gm)	4	8
Imipenem (Imp)	4	8
Ofloxacina (Ofl)	1	4
Piperacilina (Pi)	16	64
Tetraciclina (Te)	4	8
Tobramicina (To)	4	8

II.5.7. TIPIFICACIÓN DE *SALMONELLA* SPP

Los aislados de *Salmonella* son conservado en medio Le Minor hasta su envío al Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* para su tipificación.

En este centro las cepas recibidas se siembran en agar McConkey para su reaislamiento y se confirma que pertenecen al género *Salmonella* por pruebas bioquímicas convencionales.

La serotipificación se realiza por microaglutinación y aglutinación en porta, utilizando sueros polivalentes y específicos preparados en su mayoría en dicho laboratorio de acuerdo a las pautas para la preparación de antisueros de *Salmonella* (Le Minor et al., 1989). En algunos casos se utilizan sueros comerciales producidos por Diagnostic Pasteur, París, Francia. El estudio de las subespecies se realiza siguiendo el método de Le Minor (1982a).

En el Centro Nacional de Referencia de *Salmonella* en España sólo se realiza la identificación de los fagotipos para los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Virchow de *Salmonella*, dada la importancia que tienen en cuanto a su alta frecuencia tanto en muestras de origen humano, como en las de origen no humano.

II.5.7.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO LE MINOR PARA CONSERVACIÓN DE CEPAS

Extracto de carne.....	5
Peptona.....	10 g
Cloruro de Sodio.....	3 g
Fosfato dibásico de Sodio.....	2 g
Agar.....	10 g
Agua destilada.....	1000 ml
pH 7.4	

Se añaden los componentes al agua destilada y se calienta llevando a ebullición hasta la disolución completa. Se distribuye a razón de 4-5 ml por tubo con tapa de rosca, se lleva al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

II.5.8. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DEL CENTRO NACIONAL DE NUTRICIÓN PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Resultado positivo: indica la presencia de *Salmonella spp* en 25 g de muestra analizada.

Resultado negativo: es la ausencia de *Salmonella spp* en 25 g de muestra analizada.

II.6. ENSAYO: MACRORRESTRICCIÓN EN CAMPO PULSADO

La macrorrestricción en campo pulsado se realiza según la técnica descrita por Smith y colaboradores (1988) adaptada para bacilos gram-negativos, que abarca fundamentalmente de cinco grandes pasos:

- 1) Preparación de los insertos y lisis celular
- 2) Lavado de los insertos
- 3) Restricción
- 4) Electroforesis
- 5) Tinción y visualización.

1) Preparación de los insertos y lisis celular

A partir de un cultivo de 18 horas en agitación a 37°C en caldo de Luria-Bertani, con una absorbancia a 450 nm y una densidad óptica de 0,6-0,7, se toman 10 ml del caldo y centrifugamos a 3000 rpm durante 10 minutos. Luego resuspendemos el sedimento y ajustamos a 1 ml de volumen final con PET IV.

Se lavan los moldes con alcohol 96° y después agua bidestilada para la formación de los insertos y dejamos secar. Una vez secos los moldes, sellamos la parte inferior con cinta adhesiva transparente.

Se prepara la cantidad necesaria de agarosa de bajo punto de fusión (Incert agarosa, FMC Bioproducts, EEUU) al 1,6% en agua para los insertos. Posteriormente se diluye la mitad con la muestra, quedando una concentración final de agarosa al 0,8%. Normalmente, se preparan cinco insertos por muestra y cada inserto tiene un volumen de 100 µl, por lo que se necesitan 300 µl de agarosa al 1,6%.

Se disuelve la agarosa por calor y la mantenemos a 40-45°C. Mientras, transferimos 300 µl de muestra resuspendida en el tampon PET IV a un tubo de microcentrifuga y añadimos 300 µl de agarosa de bajo punto de fusión.

La mezcla es homogeneizada y sin dejar que enfriar dispensamos 100 µl en cada bloque del molde, dejando solidificar a 4°C durante aproximadamente 1 hora.

Seguidamente, sacamos los insertos del molde, retirando la cinta adhesiva y con ayuda de una pera de goma ejercemos presión en la parte superior para que el inserto salga. De esta manera lo transferimos directamente a un tubo de 2 ml con tapa de rosca con ESP. Incubamos a 50°C durante 24 horas. En esta solución los insertos pueden guardarse a 4°C durante un año aproximadamente.

2) Lavado de los insertos

Antes de proceder a la digestión con enzimas de restricción es necesario inactivar la proteinasa K y eliminar los detergentes utilizados para la lisis celular, ya que éstos podrían inactivar los enzimas de restricción. Se realizan de 4-5 lavados a cada inserto con 1 ml de TE. Es importante en esta operación manipular adecuadamente el inserto ayudandonos con una pipeta Pasteur cerrada y con un ángulo en la punta. Al completar los lavados se dejan 10 minutos a temperatura ambiente y luego los ponemos a 4°C para que solidifique el inserto.

En el mismo tubo de microcentrifuga se cambia el TE con otra pipeta Pasteur, sin tocar el inserto y sin tomarse mucho tiempo para evitar la desecación del mismo.

3) Restricción de los insertos

La digestión del ADN, al igual que la lisis celular, tiene lugar en el inserto por difusión del enzima a través de la agarosa. Los enzimas que se utilizan para el análisis de restricción del ADN cromosómico en electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) son endonucleasas de baja frecuencia de corte, por lo que se generan fragmentos grandes y poco numerosos.

En este caso la digestión del ADN cromosómico se realiza según el método descrito por Smith y colaboradores (1988). Para la digestión de 1/3 de inserto se utilizó 30 U de enzima *XbaI* (Pharmacia P-L Biochemicals, Suecia) en un volumen total de 200 μ l.

En un tubo de microcentrifuga añadimos en este mismo orden: 1) 143 μ l de agua destilada estéril, 2) 2 μ l de BSA (suero bovino, Sigma), 3) 20 μ l de tampon de restricción 10 X, 4) 1/3 de inserto y 5) 30 U de enzima de restricción.

Esta mezcla la incubamos durante 18 horas con agitación suave a 37°C. Una vez finalizada la digestión se neutraliza el enzima de restricción añadiendo 25 μ l de EDTA 0,5 M, 125 μ l de Sarcosil al 20% y 25 μ l de Proteinasa K (10 mg/ml) e incubamos a 50°C durante 4 horas.

4) Electroforesis

Para la separación de fragmentos de alto peso molecular de ADN se han descrito diferentes variaciones de la electroforesis en campo pulsado, diferenciándose éstos fundamentalmente por la disposición de los electrodos. El sistema de electroforesis empleado en este caso fue el Contour Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF DRII, BIORAD) creado por Chu y colaboradores en 1989.

En este sistema el campo eléctrico se genera por electrodos puntuales (24) equidistantes entre si y dispuestos en forma hexagonal. Los electrodos que determinan el ángulo seleccionado, que puede variar entre 60° y 120°, presentarán mayor potencial que el resto de los electrodos, que funcionarán con potenciales intermedios. Este hecho provocará un campo eléctrico homogéneo a lo largo de todo el gel.

Tiene como ventajas, la migración recta de las calles con una buena resolución de los fragmentos y que permite separar fragmentos de alto peso

molecular (aproximadamente 10.000 Kb) y como inconveniente su compleja electrónica.

Para realizar la electroforesis comenzamos preparando el gel de agarosa (100 ml) al 1% en TBE 0.5X, calentamos la mezcla en el microondas hasta su completa homogenización y ajustamos el volumen final a 100 ml, dejando enfriar a 50°C.

Luego se limpian con etanol y agua destilada el soporte del gel, la goma formadora del gel y el peine. Se disponen la goma formadora del gel y el peine sobre el soporte en la orientación correcta y vertimos la agarosa hasta cubrir la mitad de los dientes del peine, eliminando las burbujas y dejando solidificar. Finalmente, se retira la goma formadora del gel y el peine.

Se añaden 500 ml de TBE 0.5X a la cubeta de electroforesis y conectamos el sistema de recirculación del tampón. Se carga el ADN digerido en el gel, transfiriendo los insertos con la ayuda de una pipeta Pasteur sobre la superficie interior de papel parafilm (estéril) y con un cubreobjeto cortamos un trozo (1/3) de inserto de aproximadamente 1 mm de grosor, colocando el inserto cortado en el pocillo del gel, con la precaución de no romperlo.

Como marcador de peso molecular y control de electroforesis se utiliza el ADN de concatámeros de fago lambda (Lambda ladder PFGE Marker, Biolabs, EEUU), cuyos pesos moleculares son: 533.5 Kb, 485.0 Kb, 388.0 Kb, 339.5 Kb, 291.0 Kb, 242.5 Kb, 194.0 Kb, 145.5, 97.0 Kb y 48.5 Kb. Sellamos todos los pocillos con agarosa al 0,5%.

Se dispone el gel en la cubeta, cuidando que éste quede cubierto con el tampón, colocamos los electrodos y la tapa de la cubeta y conectamos la cubeta al pulsador y fuente de alimentación.

Las condiciones de electroforesis se determinaron en función de los fragmentos obtenidos (número y peso molecular aproximado) a partir de una primera

electroforesis tentativa con una rampa de pulsos de 20-35 durante 24 horas a 6 V/cm y temperatura de 14°C.

5) Tinción y visualización

Finalizada la electroforesis, la visualización de los fragmentos de ADN se realiza mediante la tinción del gel con bromuro de etidio, para lo cual trasladamos el gel a una bandeja donde se han dispuesto con anterioridad 500 ml de TBE 0.5X y 50 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) e incubamos con agitación suave durante 20 minutos.

Se lava el gel con TBE 0.5X durante 30 minutos, pudiéndose guardar en estas condiciones el gel a 4°C durante varias semanas. Visualizamos el gel mediante un transiluminador y fotografiamos.

II.6.1. MEDIOS Y SOLUCIONES PARA EL CAMPO PULSADO

II.6.1.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO DE LURIA-BERTANI (LB)

Bacto peptona (DIFCO).....	10 g
Bacto extracto de levaduras.....	5 g
Cloruro de Sodio.....	10 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH 7.5

Disolver por calentamiento y dispensar 10 ml en botellas de 50 ml con tapa de rosca. Autoclavar a 120° C durante 20 minutos.

II.6.1.2. SOLUCIONES

PET IV (10 nM Tris-base – 1 M NaCl)

Tris-base 1M	10 ml
Cloruro de Sodio	58,4 g
Agua destilada.....	900 ml
pH 7.6	

Autoclavar a 120° C durante 20 minutos.

ESP (0,5 nM EDTA - 1% lauril sarcosine- 40 ml Proteinasas K)

EDTA.....	186 g
Agua destilada.....	700 ml
pH 9-9,5	

Disolver y ajustar el pH con Cloruro de Sodio (NaCl) y el volumen a 950 ml. Autoclavar a 120° C durante 20 minutos y añadir 50 ML lauril sarcosine al 20% (sarcosil). En el momento de su uso añadir Proteinasas K 10 mg/ml por cada 2 ml (200 µl).

Tampon TE (10 mM Tris-base- 0,1 mM EDTA).

Tris-base 1 M	10 ml
EDTA 0,1 M.....	1 ml
Agua destilada.....	898 ml

SUERO BOVINO: BSA 20 mg/ml

BSA (SIGMA).....	200 mg
Agua destilada estéril.....	10 ml

Disolver y alicuotar a razón de 50 μ l. Conservar a -20° C.

TBE 5X (Tris-base-ácido bórico-EDTA)

Tris-base.....	121,1 g
Acido bórico.....	61,83 g
EDTA.....	0,745 g
Agua destilada.....	2000 ml

Se disuelven los componentes y se lleva al autoclave a 120° C durante 20 minutos.

II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados ha sido realizado con los programas Analysis y Statcalc del paquete informático Epi-Info V6.02 de los Centers for Disease Control (CDC) de Atlanta , Estados Unidos.

A través del programa Analysis se obtienen los listados, frecuencias y tablas de los resultados, ordenándose los datos en forma individual o mediante cruce de variables.

Con el programa Statcalc se realiza la prueba del chi cuadrado (χ^2), usando tablas de contingencia 2 x N según cada caso, obteniéndose el valor de χ^2 derivado de la fórmula no corregida. La fórmula usada es la siguiente:

$$\mathbf{C^2 \text{ no corregido} = N ((a \times d) - (b \times c))^2 / (H1 \times H2 \times V1 \times V2)}$$

Se dan los valores de p para un grado de libertad usando la fórmula de Poole y Borchers (1977) y si fuese lo apropiado se realiza el cálculo exacto de probabilidades de Fisher según Rosner (1982), en el caso de que el valor de una de las celdillas sea inferior a 5.

III. RESULTADOS

En este capítulo se revisa la exposición de los resultados obtenidos en las diferentes muestras de pollo analizadas, representándose los datos obtenidos en histogramas de frecuencia, con el fin de facilitar su valoración e interpretación final.

III.1. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA*

III.1.1. TOTAL DE AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA*

En la Tabla 13 se presentan los resultados globales, expresados en números absolutos y correspondiente porcentaje, de los aislamientos de *Salmonella* según todos los orígenes y todos los tipos de muestras. El porcentaje de aislamiento del total de muestras de pollo analizadas es de 16,5.

Tabla 13. Aislamientos de *Salmonella* del total de muestras de pollo ensayadas

<i>RESULTADOS</i>	Nº	%
Negativos	339	83,5
Positivos	67	16,5
Total	406	100,0

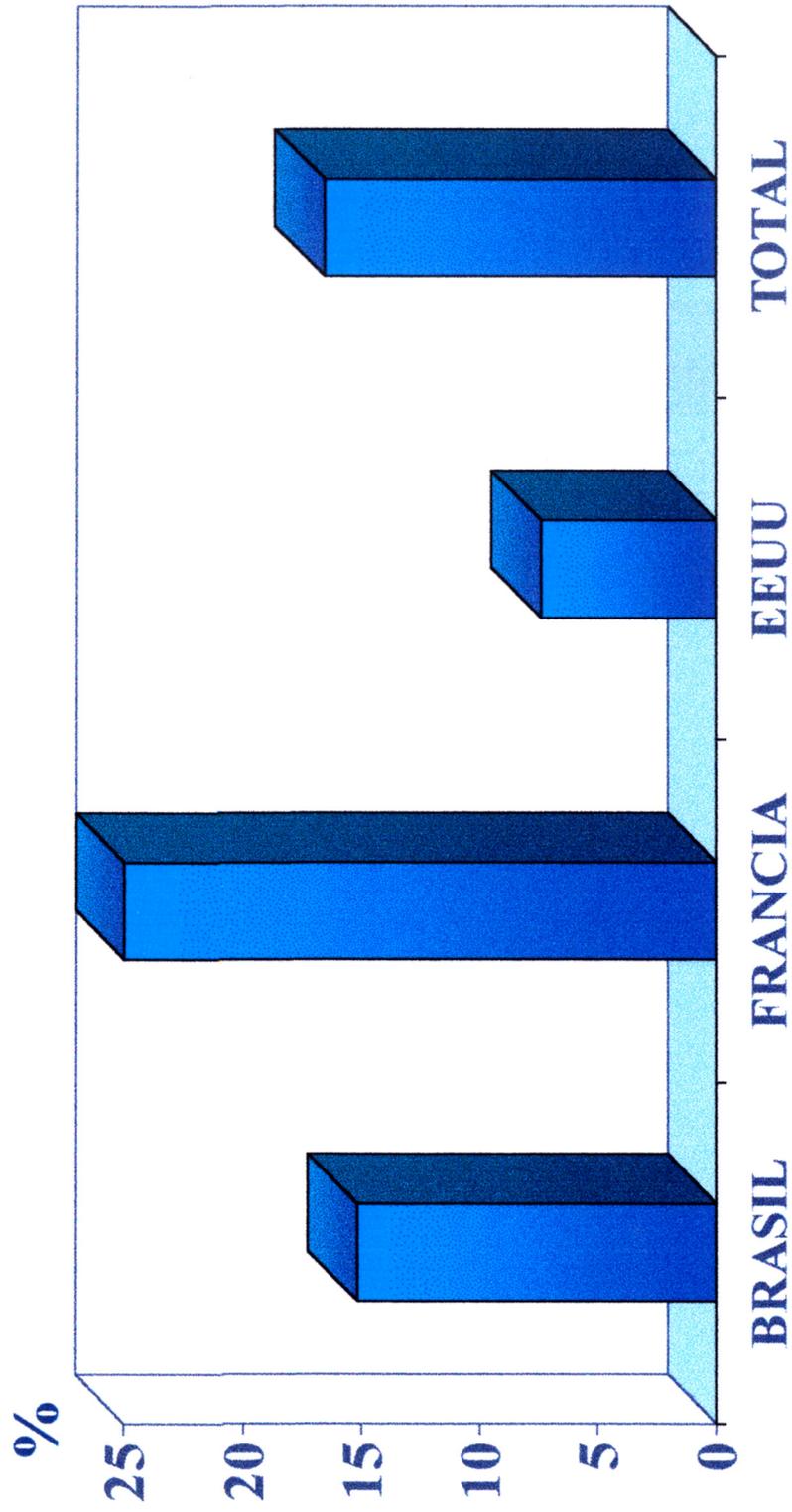
III.1.2. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN ORIGEN

En la Tabla 14 se presenta los aislamientos de *Salmonella* expresados en número y porcentaje según el país de origen de la muestra. La frecuencia de aislamiento del total de muestras de pollo analizadas de Brasil, Francia y Estados Unidos es de 15,2%, 25,0 % y 7,4% respectivamente.

Tabla 14. Aislamientos de *Salmonella* del total de muestras de pollo ensayadas, según origen

PAÍS	NEGATIVOS		POSITIVOS		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	
Brasil	257	84,8	46	15,2%	303
Francia	57	75,0	19	25,0%	76
EEUU	25	92,6	02	7,4%	27
Total	339	83,5	67	16,5%	406

GRÁFICO 3
AISLAMIENTOS DE SALMONELLA POR PAÍSES



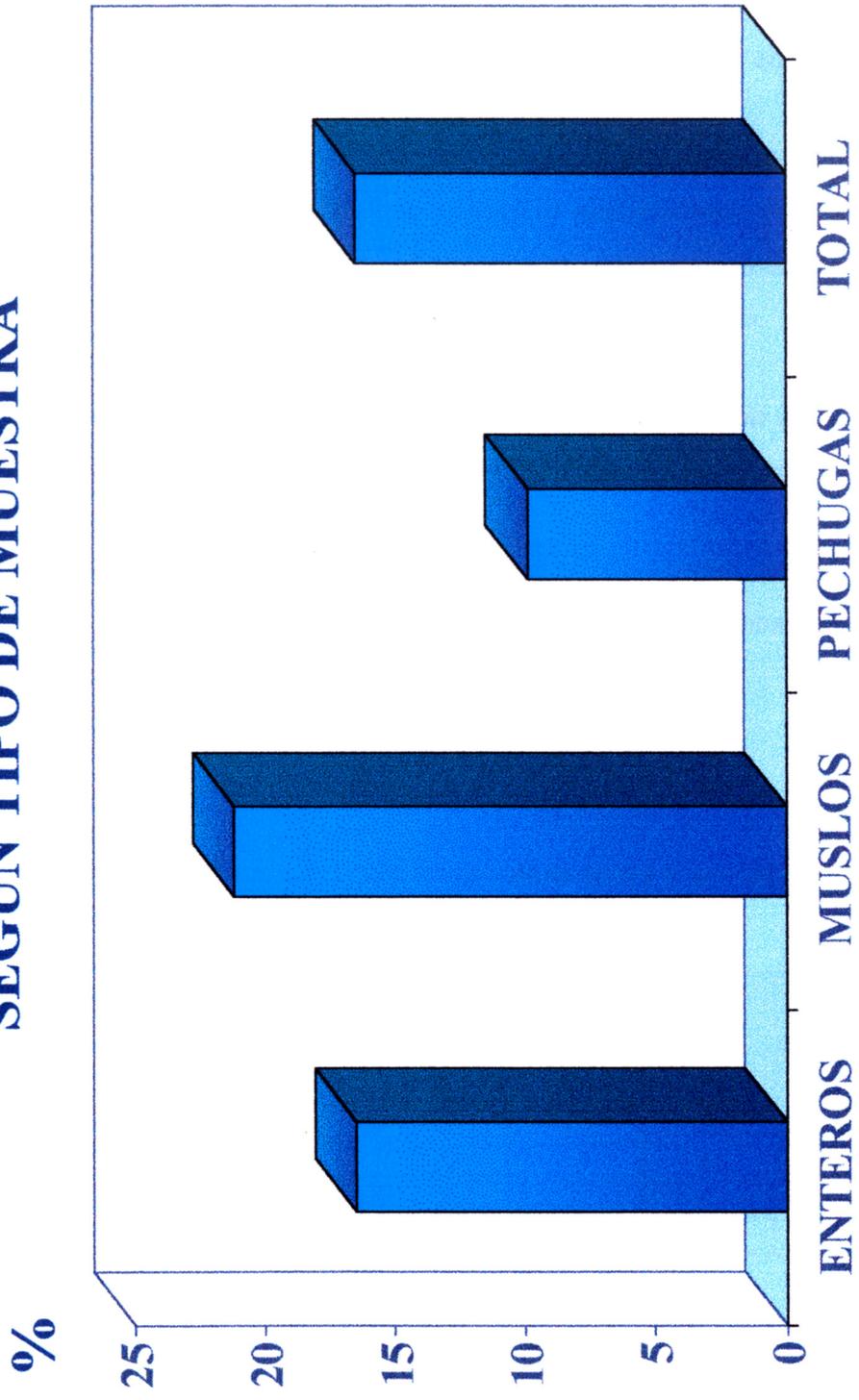
III.1.3. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN TIPO DE MUESTRAS

En la Tabla 15 se recoge los valores absolutos y porcentuales de los aislamientos de *Salmonella* según el tipo de muestra, es decir pollos enteros, muslos o pechugas. El porcentaje es de 21,2 en muslos, 16,5 en pollos enteros y 9,9 en pechugas.

Tabla 15. Contaminación por *Salmonella* del total de muestras de pollo ensayadas, según tipo de muestra

MUESTRAS	NEGATIVOS		POSITIVOS		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	
Muslos	134	78,8	36	21,2	170
Pechugas	109	90,1	12	9,9	121
Enteros	96	83,5	19	16,5	115
Total	339	83,5	67	16,5	406

GRÁFICO 4
AISLAMIENTOS DE SALMONELLA
SEGÚN TIPO DE MUESTRA



III.1.4. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN TIPO DE MUESTRA Y UNIDAD ANALÍTICA PROCESADA

En la Tabla 16 se especifica el número de aislamientos para cada tipo de muestra, considerando cuales de éstas lo han sido en piel, en músculo y en ambos.

En el caso de los muslos, en los que se analizó siempre músculo y piel, se obtuvo 50 unidades analíticas positivas, en 14 muestras se aisló *Salmonella* en ambas unidades analíticas (28), 16 en piel y no en músculo y 6 sólo en músculo.

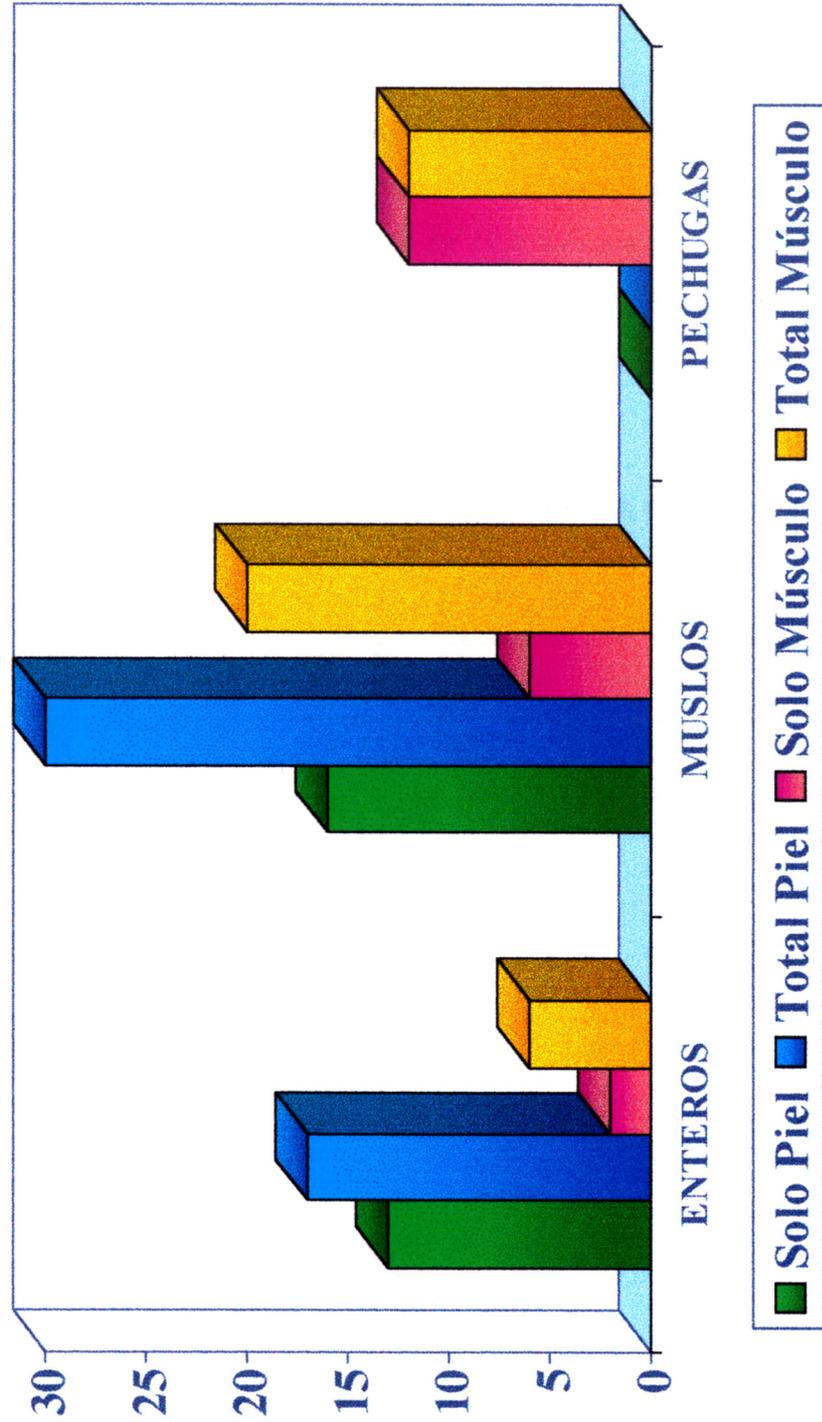
En pechugas, evidentemente sólo aparece aislados de *Salmonella* en músculo (12 unidades analíticas positivas), porque no se comercializan pechugas con piel.

En pollos enteros, en los que se analizó siempre músculo y piel, se obtuvo 23 unidades analíticas positivas, en 4 muestras se aisló *Salmonella* en ambas unidades analíticas (8), 13 en piel y no en músculo y 2 sólo en músculo.

Tabla 16. Aislamientos de *Salmonella* según tipo de muestra y unidad analítica procesada

Muestras	Unidades Analíticas Procesadas	Unidades Analíticas Positivas	Sólo Piel +	Sólo Músculo +	Ambas Unidades Analíticas +	Total Piel +	Total Músculo +
<i>Muslos</i>	340	50	16	6	14	30	20
Pechugas	121	12	0	12	0	0	12
Enteros	230	23	13	2	4	17	6
Total	691	85	29	20	18	47	38

GRÁFICO 5
 AISLAMIENTOS DE SALMONELLA SEGÚN TIPO DE
 MUESTRA Y UNIDAD ANALÍTICA



III.1.5. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN PAÍS Y TIPO DE MUESTRA

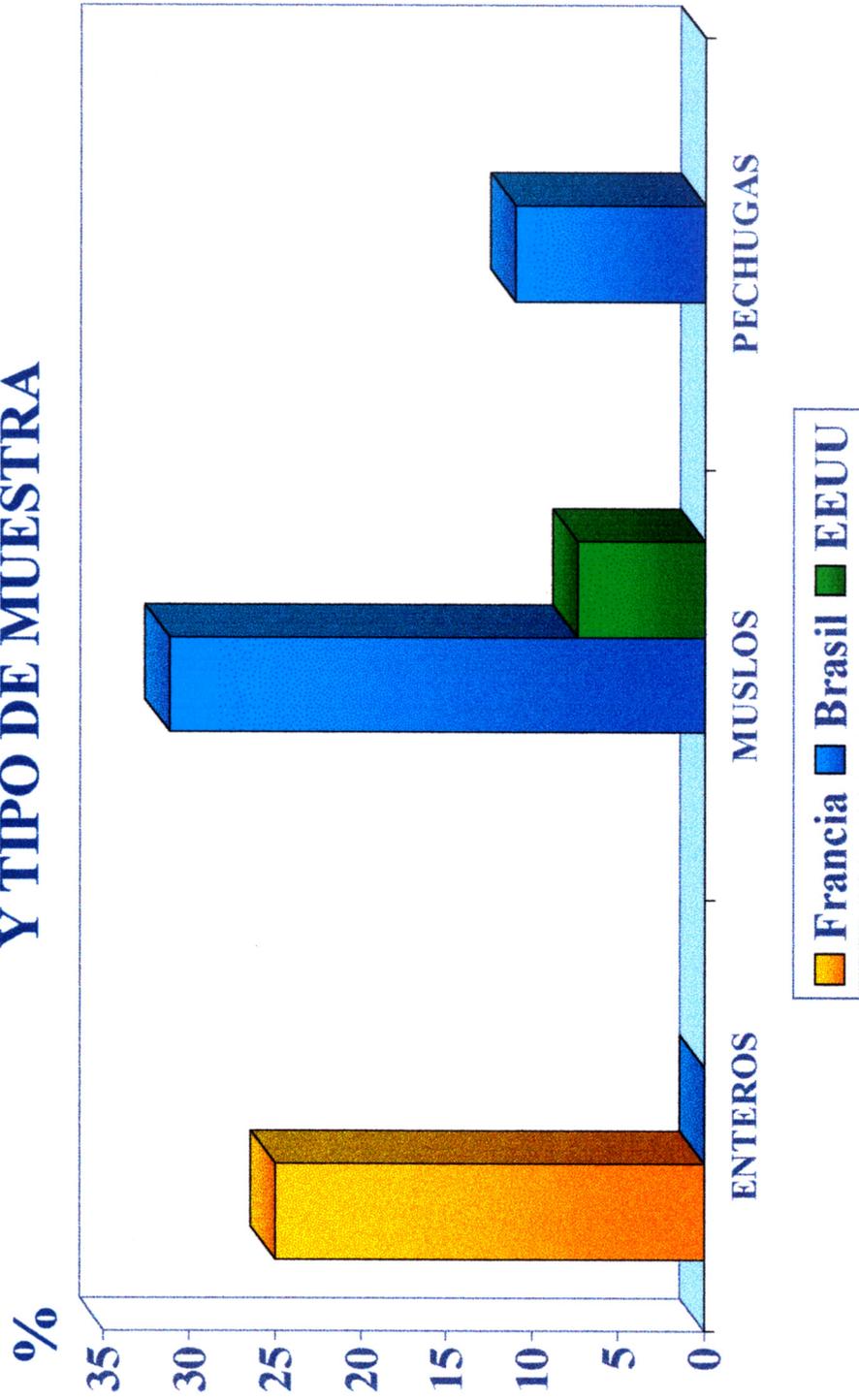
En la Tabla 17 6 se refleja el número de muestras positivas y su correspondiente porcentaje, por países.

En muslos se obtuvieron un 31,2% y 7,4% de muslos con *Salmonella* de Brasil y Estados Unidos respectivamente. En cuanto a las pechugas, todas procedentes de Brasil, el porcentaje de *Salmonella* es de 11,0. Los aislamientos en pollos enteros correspondieron a un 25,0% para Francia y un 0,0% para Brasil.

Tabla 17. Aislamiento de *Salmonella* del total de muestras de pollo ensayadas, por país y tipo de muestra

MUESTRAS	BRASIL		FRANCIA		EEUU	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Muslos	34	31,2	0	0,0	2	7,4
Pechugas	12	11,0	0	0,0	0	0,0
Enteros	0	0,0	19	25,0	0	0,0
Total	46	15,2	19	25,0	2	7,4

GRÁFICO 6
AISLAMIENOS DE SALMONELLA SEGÚN PAÍS
Y TIPO DE MUESTRA



III.2. SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS.

III.2.1. TOTAL DE SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS

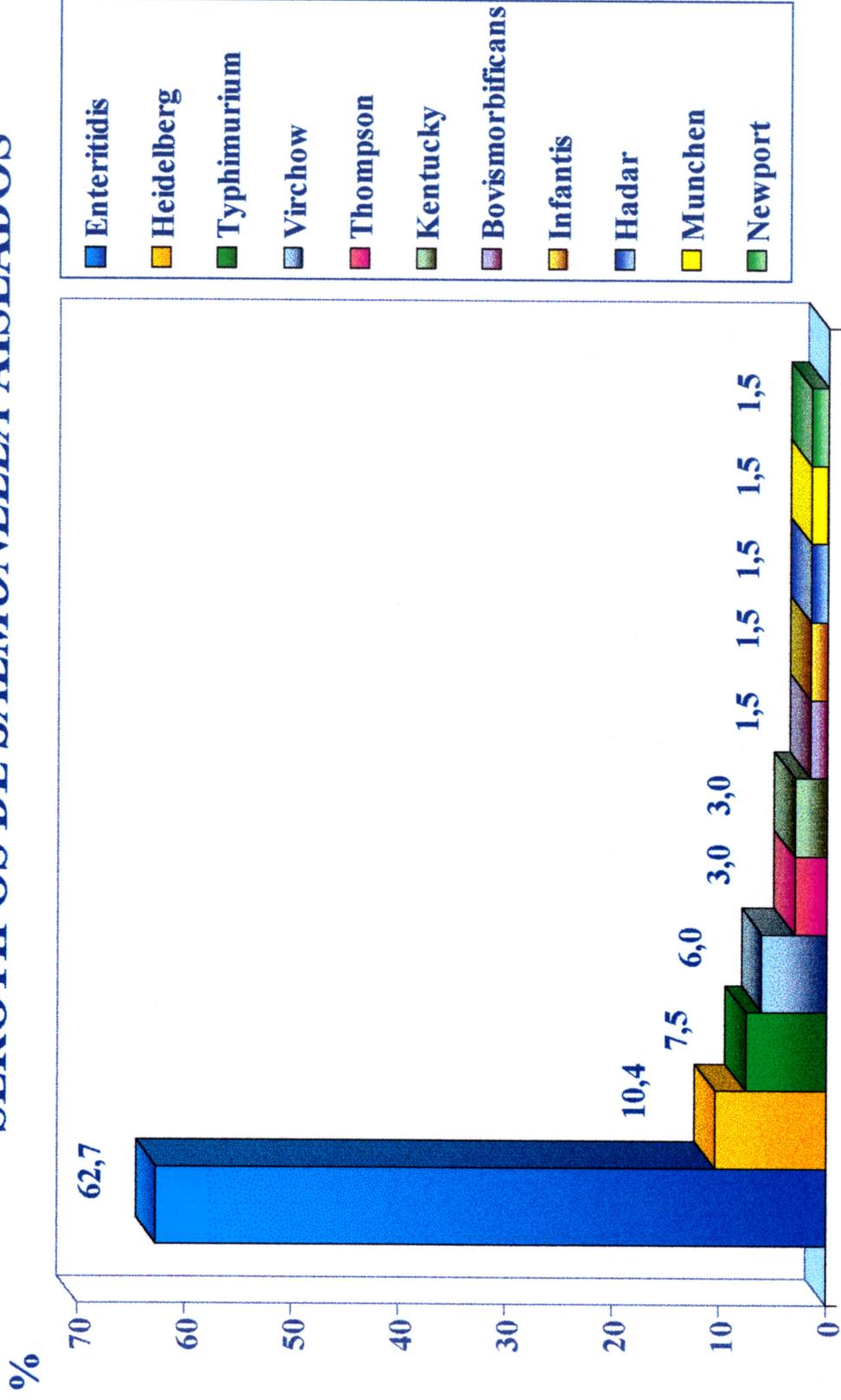
En la Tabla 18 se expresan los valores absolutos y porcentuales de los serotipos identificados. En todos aquellos casos en que para la misma muestra aislamos tanto en piel como en músculo, lo hemos considerado como un solo aislado.

El serotipo predominante en nuestro estudio es *S. enteritidis* (62,7%), seguido en orden de frecuencia por *S. heidelberg* (10,4%), *S. typhimurium* (7,5%) y *S. virchow* (6,0%) como se observa en el Gráfico 7.

Tabla 18. Distribución de frecuencia de Serotipos de *Salmonella* aislados

<i>SEROTIPOS</i>	Nº	%
Enteritidis	42	62,7
Heidelberg	07	10,4
Typhimurium	05	7,5
Virchow	04	6,0
Kentucky	02	3,0
Thompson	02	3,0
Bovismorbificans	01	1,5
Hadar	01	1,5
Infantis	01	1,5
Munchen	01	1,5
Newport	01	1,5
Total	67	100,0

GRÁFICO 7
SEROTIPOS DE SALMONELLA AISLADOS



III.2.2. SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS SEGÚN ORIGEN Y TIPO DE MUESTRA

En la Tabla 19 se recogen los resultados de los serotipos de *Salmonella* aislados por origen, es decir país y tipo de muestra.

En Brasil se aislaron cuatro serotipos: Enteritidis (30 en muslos y 9 en pechugas), Heidelberg (4 en muslos), Thompson (2 en pechugas) y Munchen (1 en pechuga).

En Francia, donde sólo se analizaron pollos enteros, se aislaron ocho serotipos: Typhimurium (5), Virchow (4), Enteritidis (3), Heidelberg (3), Infantis (1), Hadar (1), Newport (1) y Bovismorbificans (1).

En Estados Unidos, donde sólo se analizaron muslos, se aisló un único serotipo: Kentucky (2).

Tabla 19. Distribución de frecuencia de Serotipos de *Salmonella*

SEROTIPOS	BRASIL		FRANCIA	EEUU	TOTAL
	Muslos	Pechuga	Enteros	Muslos	
Enteritidis	30	09	03	-	42
Heidelberg	04	-	03	-	07
Typhimurium	-	-	05	-	05
Virchow	-	-	04	-	04
Kentucky	-	-	-	02	02
Thompson	-	02	-	-	02
Bovismorbificans	-	-	01	-	01
Hadar	-	-	01	-	01
Infantis	-	-	01	-	01
Munchen	-	01	-	-	01
Newport	-	-	01	-	01
Total	46		19	02	67

GRÁFICO 8
SEROTIPOS DE SALMONELLA AISLADOS
EN POLLOS DE BRASIL

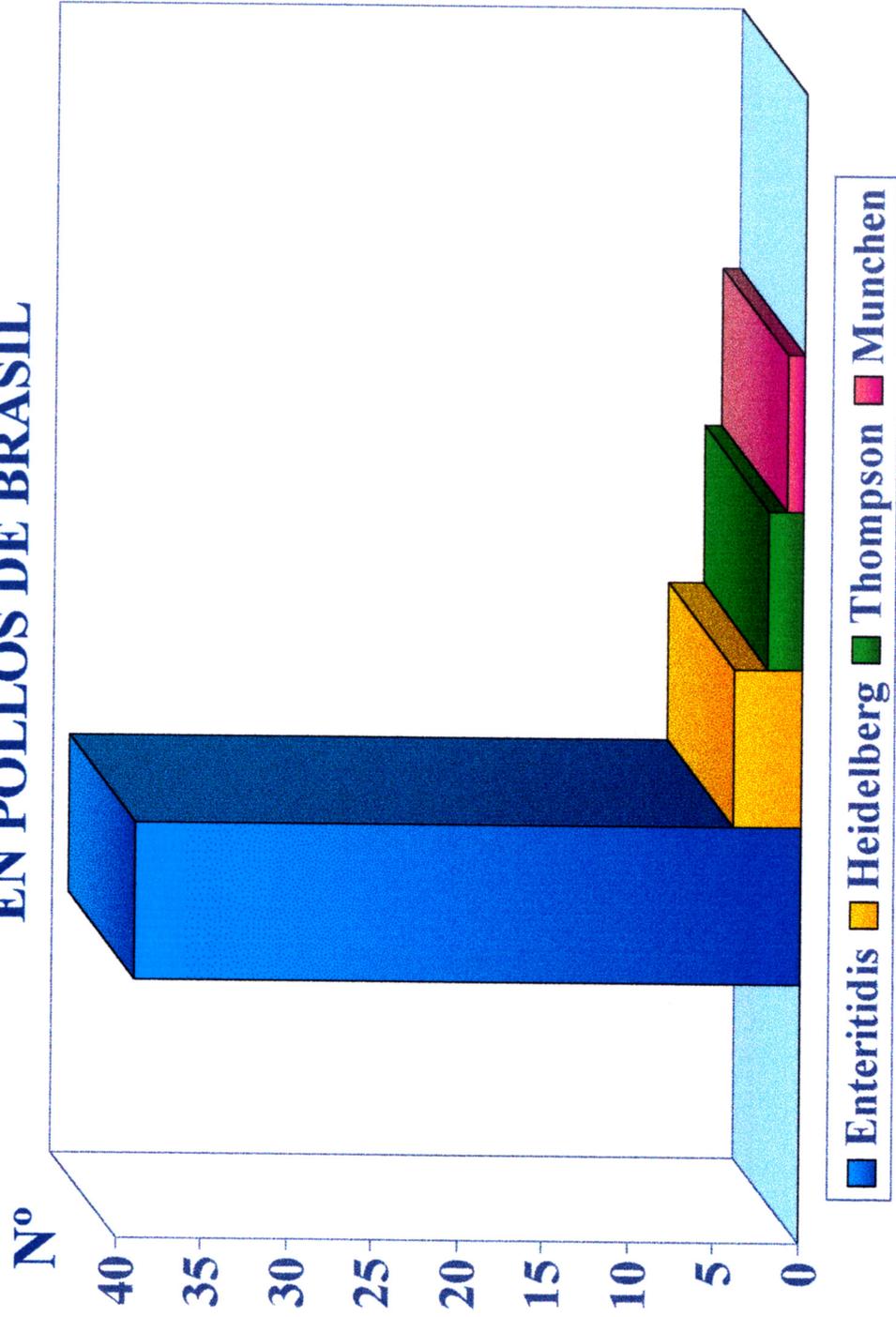


GRÁFICO 9
SEROTIPOS DE SALMONELLA AISLADOS
EN POLLOS DE FRANCIA

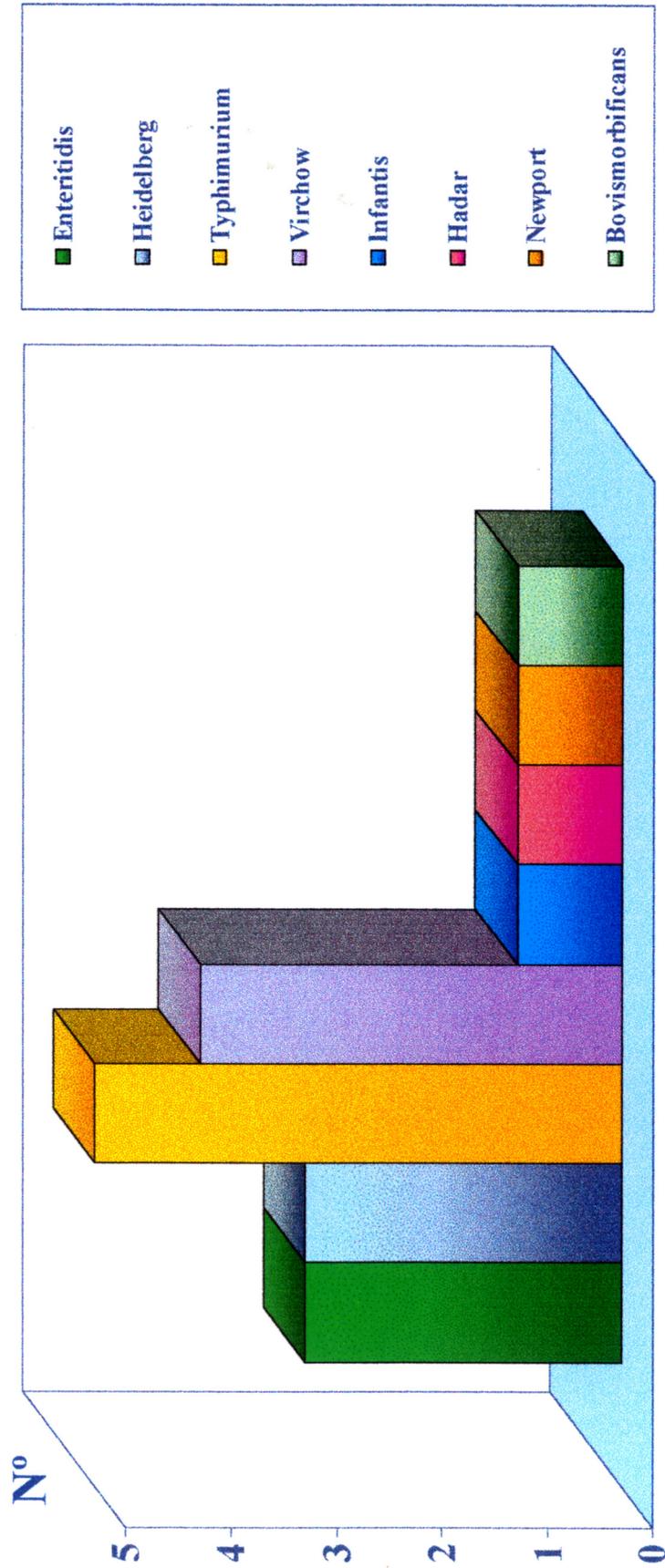
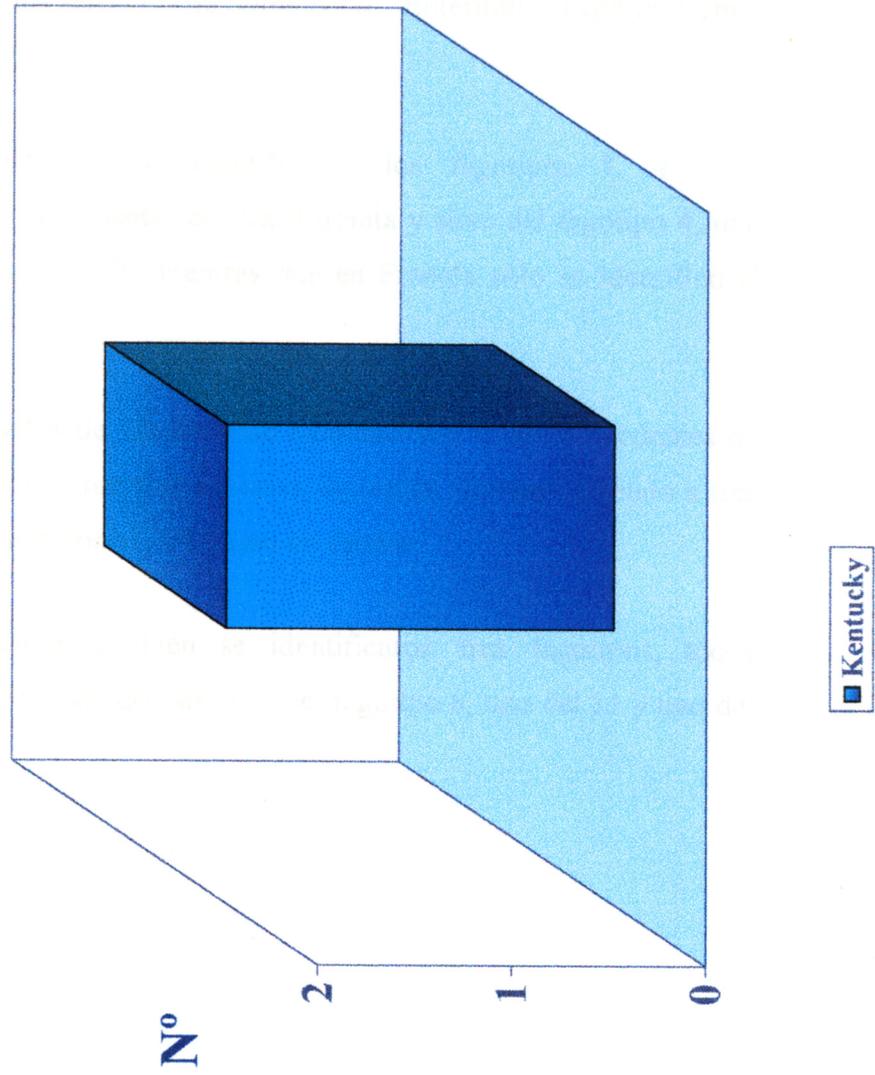


GRÁFICO 10
SEROTIPO AISLADO DE SALMONELLA
EN POLLOS DE ESTADOS UNIDOS



III.3. FAGOTIPOS DE *SALMONELLA* IDENTIFICADOS

III.3.1. FAGOTIPOS DE *S. ENTERITIDIS*, *S. TYPHIMURIUM* Y *S. VIRCHOW* IDENTIFICADOS SEGÚN PAÍS DE ORIGEN

En la Tabla 20 y Gráficos 11 y 12 se relaciona la distribución de los fagotipos de *Salmonella* según el país de origen. Como se mencionó en el capítulo II.5.7, sólo se realizó la tipificación de los serotipos de *Salmonella* : Enteritidis, Typhimurium y Virchow.

De *Salmonella enteritidis* se identificaron los fagotipos 1, 4 y 7, correspondiendo a muestras procedentes de Brasil treinta y siete del fagotipo 4, uno del fagotipo 1 y uno del fagotipo 7, mientras que en Francia sólo se identificó el fagotipo 4 (en tres muestras).

En cuanto a los aislados de *Salmonella typhimurium*, todos procedentes de muestras de Francia, se identificaron tres diferentes fagotipos, correspondiendo a tres aislados del fagotipo 204 c, uno con el 204 y uno no tipable.

De *Salmonella virchow* también se identificaron tres fagotipos, todos procedentes de muestras de Francia: dos aislados del fagotipo 8, uno del 31 y uno del 37.

Tabla 20. Distribución de frecuencia de fagotipos de *Salmonella*

FAGOTIPOS	PAISES		TOTAL
	Brasil	Francia	
Enteritidis fagotipo 1	1	-	1
Enteritidis fagotipo 4	37	3	40
Enteritidis fagotipo 7	1	-	1
Typhimurium fagotipo 204	-	1	1
Typhimurium fagotipo 204c	-	3	3
Typhimurium no tipable	-	1	1
Virchow fagotipo 8	-	2	2
Virchow fagotipo 31	-	1	1
Virchow fagotipo 37	-	1	1

GRÁFICO 11
FAGOTIPOS DE SALMONELLA
EN POLLOS DE BRASIL

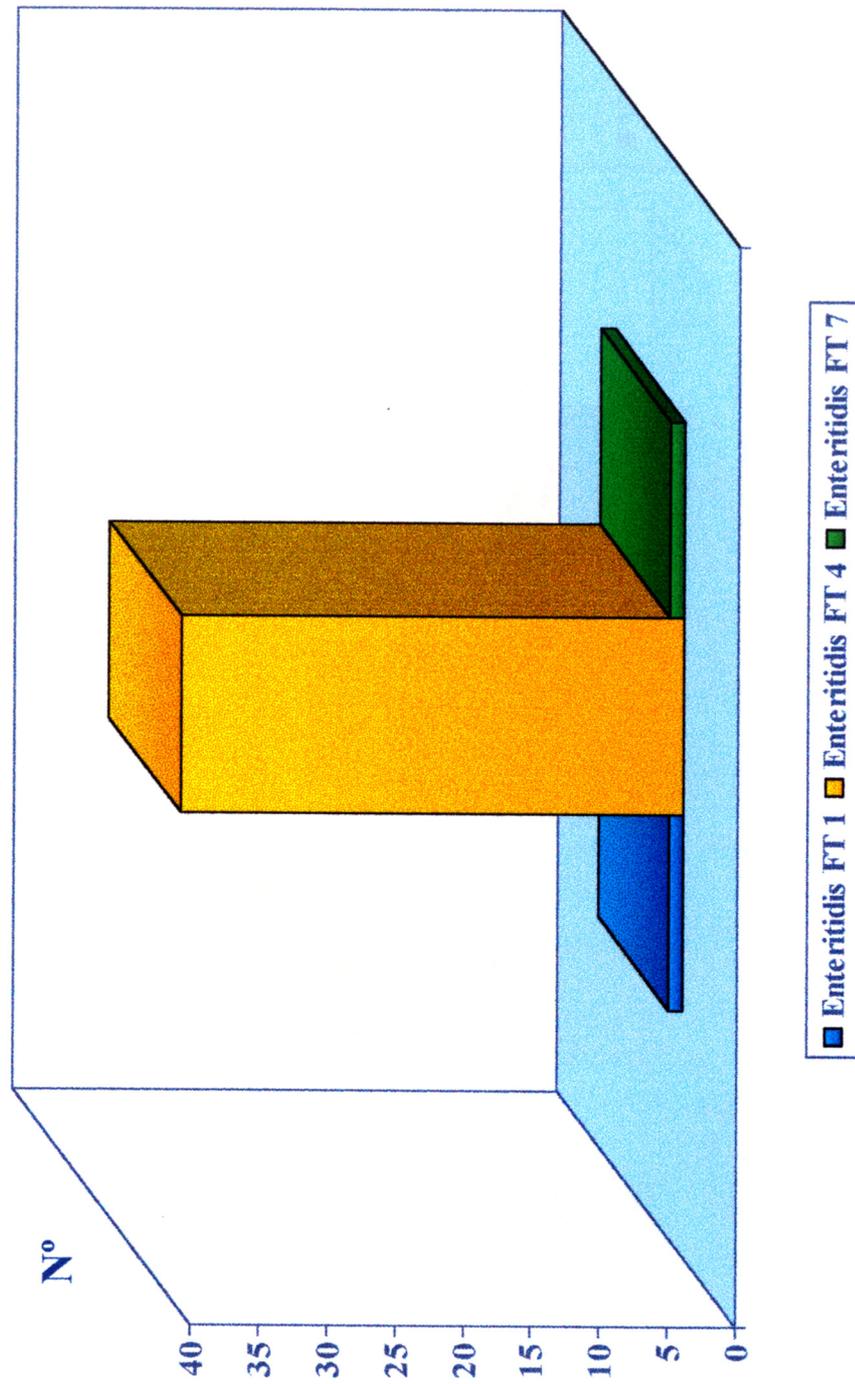
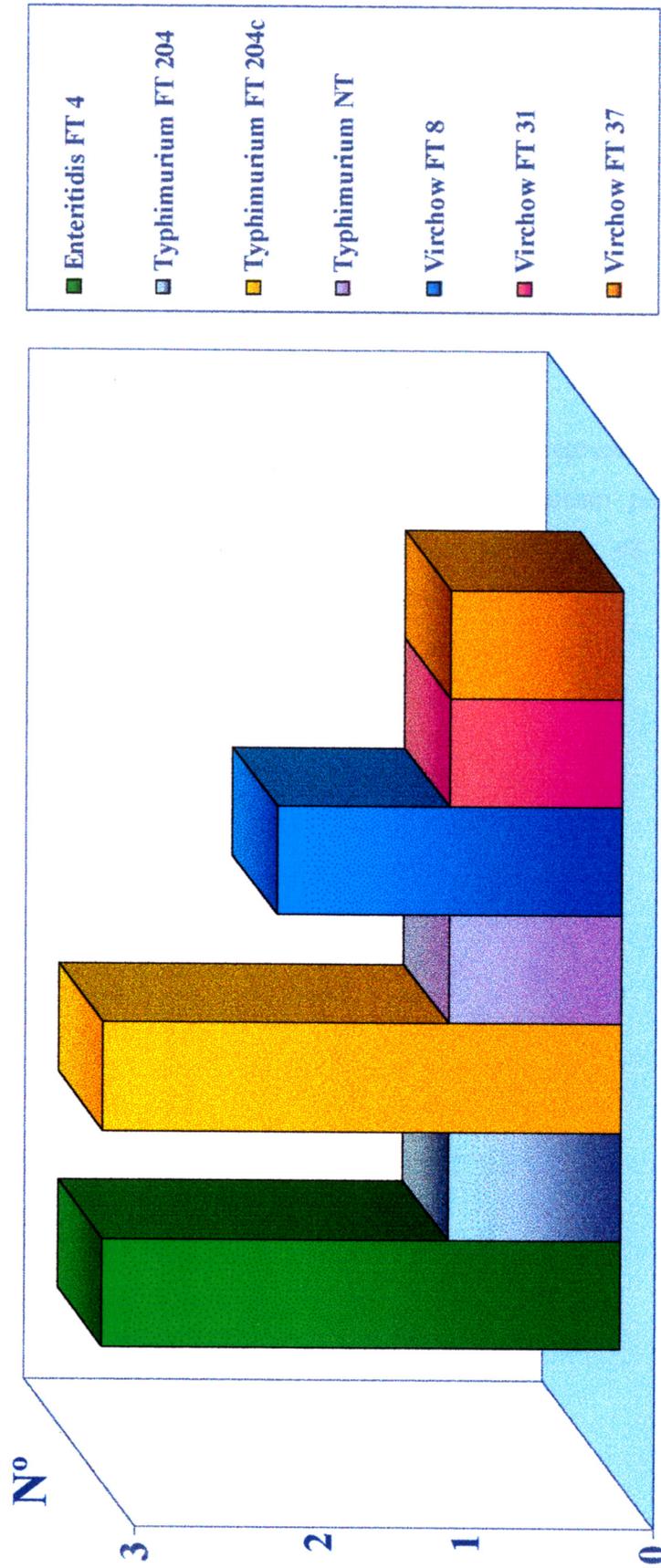


GRÁFICO 12
FAGOTIPOS DE SALMONELLA
EN POLLOS DE FRANCIA



III.4. TIPADO GENÓMICO

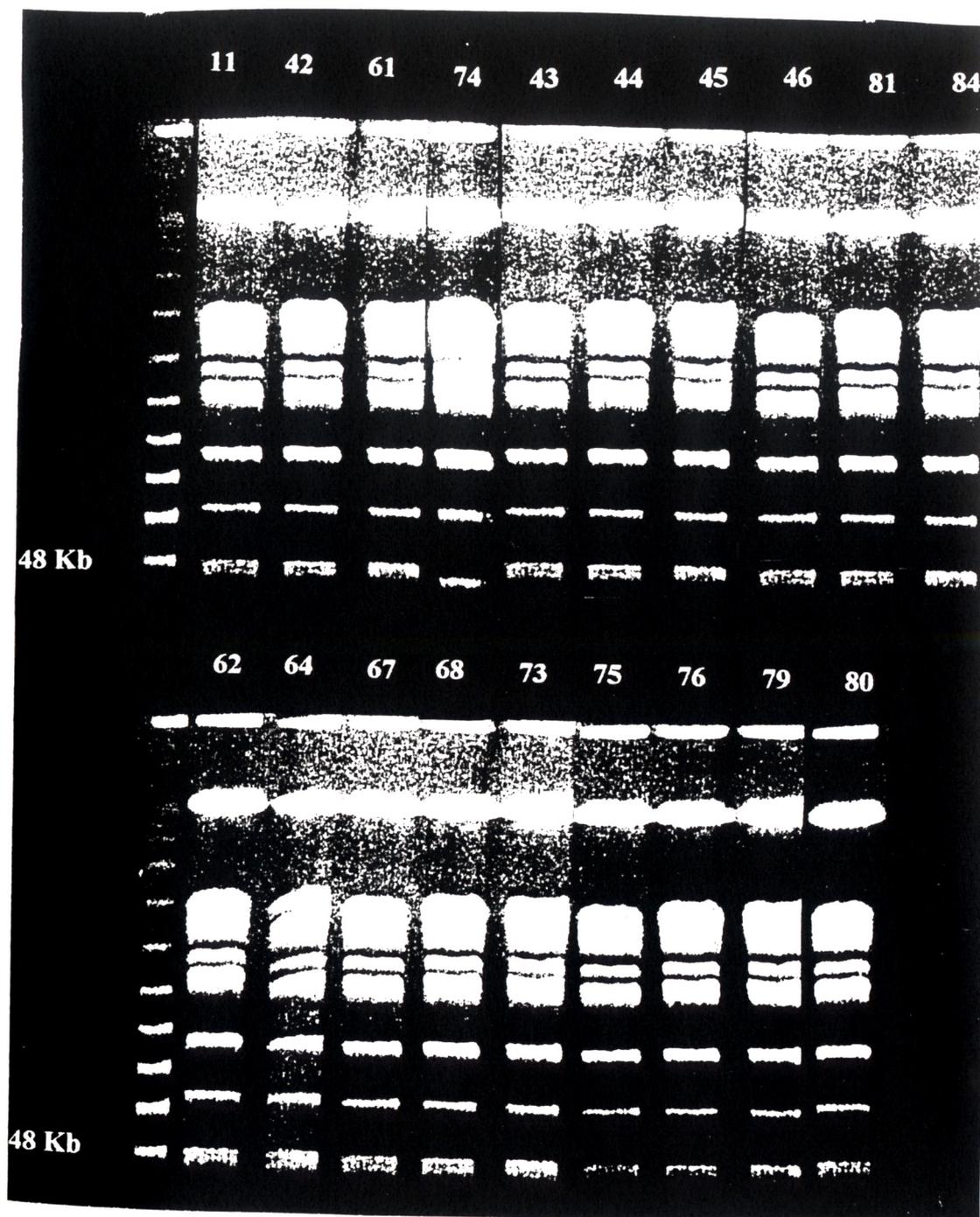
El tipado genómico, se aplicó solamente a los aislados de *Salmonella enteritidis*, debido a que es el serotipo más frecuente en este estudio. De 42 aislados de *S. enteritidis* realizamos la electroforesis en campo pulsado a 19 de ellos, obteniéndose los resultados que se expresan en la Tabla 21. Utilizando el enzima Xba I todas las cepas (11, 42, 43, 44, 45, 46, 61, 62, 64, 67, 62, 64, 67, 68, 73,75, 76, 79, 80, 81, 84) presentaron el mismo pulsotipo (Patrón A), excepto la cepa 74 (Patrón B).

Podemos ver los patrones de banda (A y B) que representan el pulsotipo de los aislados analizados. Los dos pulsotipos se diferencian por la desaparición de una banda en el último doblete (aproximadamente de 48 Kb) mientras que el resto de cepas a este nivel presentan dos bandas.

Tabla 21. Distribución de los patrones del pulstipo de los aislados de *Salmonella enteritidis* ensayados

Nº	PAÍS	FAGOTIPO	PATRÓN
011	Brasil	4	A
042	Brasil	4	A
043	Brasil	4	A
044	Brasil	4	A
045	Brasil	4	A
046	Brasil	4	A
061	Brasil	4	A
062	Brasil	4	A
064	Brasil	4	A
067	Brasil	4	A
068	Brasil	4	A
073	Brasil	4	A
074	Brasil	4	B
075	Francia	4	A
076	Brasil	4	A
079	Brasil	4	A
080	Brasil	4	A
081	Brasil	4	A
084	Brasil	1	A

Figura 1
Patrones de banda de cepas de *Salmonella enteritidis*



III.5. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE SALMONELLA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

III.5.1. RESULTADOS GLOBALES

En la Tabla 22 se recoge la distribución absoluta y porcentual de los resultados de susceptibilidad del total de los aislados de *Salmonella* frente a los 14 antibióticos ensayados. Las mayores resistencias las presentan frente a Piperacilina, Aztreonam, Cloramfenicol, Tetraciclina y Ampicilina.

En relación a la resistencia de los aislados de *Salmonella* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana (Ampicilina, Amoxicilina/clavulánico, Piperacilina, Imipenem, Aztreonam y Cefazolina), se observa que las mayores resistencias se presentan frente a Piperacilina y Aztreonam, en ambos casos con una resistencia de 52,2 % y la mayor sensibilidad frente a Cefazolina (resistencia de 13,4%).

En la resistencia de los aislados de *Salmonella* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas que incluye aminoglucósidos (Amikacina, Gentamicina, Tobramicina), Tetraciclina y Cloramfenicol, se observa que los antibióticos menos efectivos son el Cloramfenicol (resistencia 34,3%) y la Tetraciclina (resistencia 22,4%). Las salmonelas testadas son, en general, muy sensibles a los aminoglucósidos.

Los porcentajes de resistencia de los aislados de *Salmonella* a inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos son: un 11,9% de resistencia tanto para el Cotrimoxazol como para la Ofloxacina y un 3% frente a Ciprofloxacina.

Tabla 22. Susceptibilidad antimicrobiana del total de aislados de *Salmonella*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES		RESISTENTES	
	N°	%	N°	%
Ampicilina	54	80,6	13	19,4
Amox/clavulánico	57	85,1	10	14,9
Piperacilina	32	47,8	35	52,2
Imipenem	56	83,4	11	16,4
Aztreonam	32	47,8	35	52,2
Cefazolina	58	86,6	9	13,4
Amikacina	64	95,0	3	4,5
Gentamicina	64	95,0	3	4,5
Tobramicina	63	94,0	4	6,0
Tetraciclina	52	77,6	15	22,4
Cloramfenicol	44	65,7	23	34,3
Cotrimoxazol	59	88,1	8	11,9
Ciprofloxacina	65	97,0	2	3,0
Ofloxacina	59	88,1	8	11,9

GRÁFICO 13
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE SALMONELLA A
INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA PARED BACTERIANA

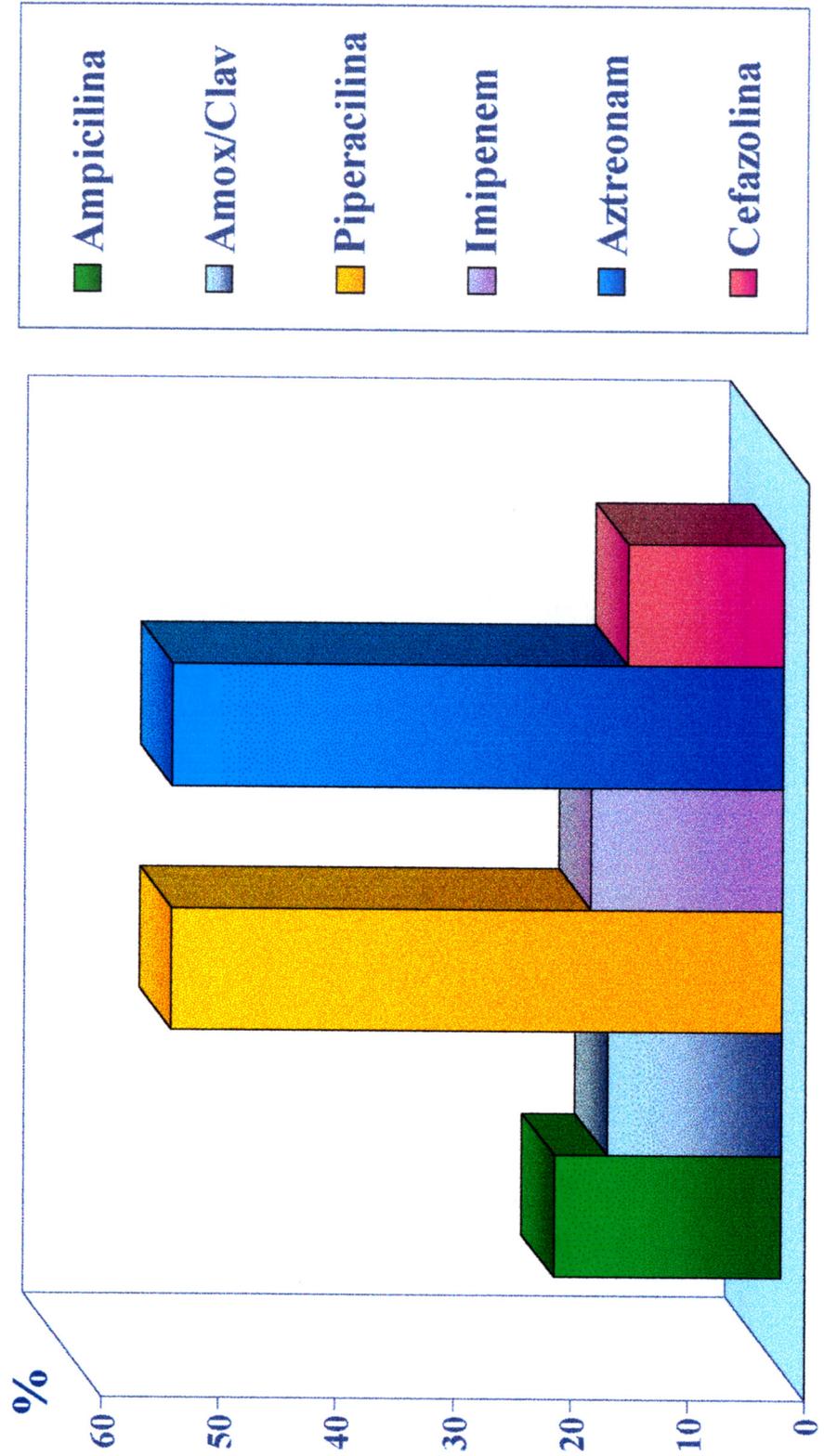


GRÁFICO 14
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
SALMONELLA A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE
PROTEÍNAS

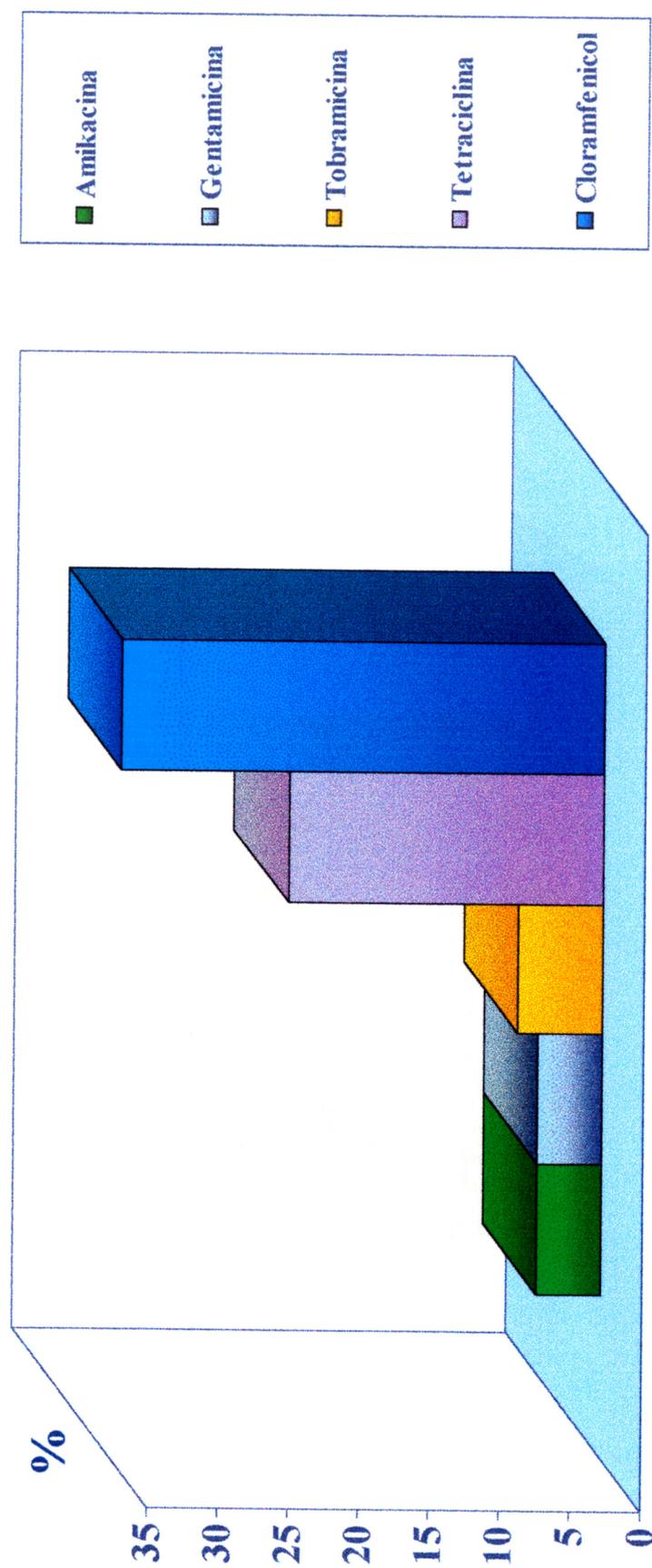
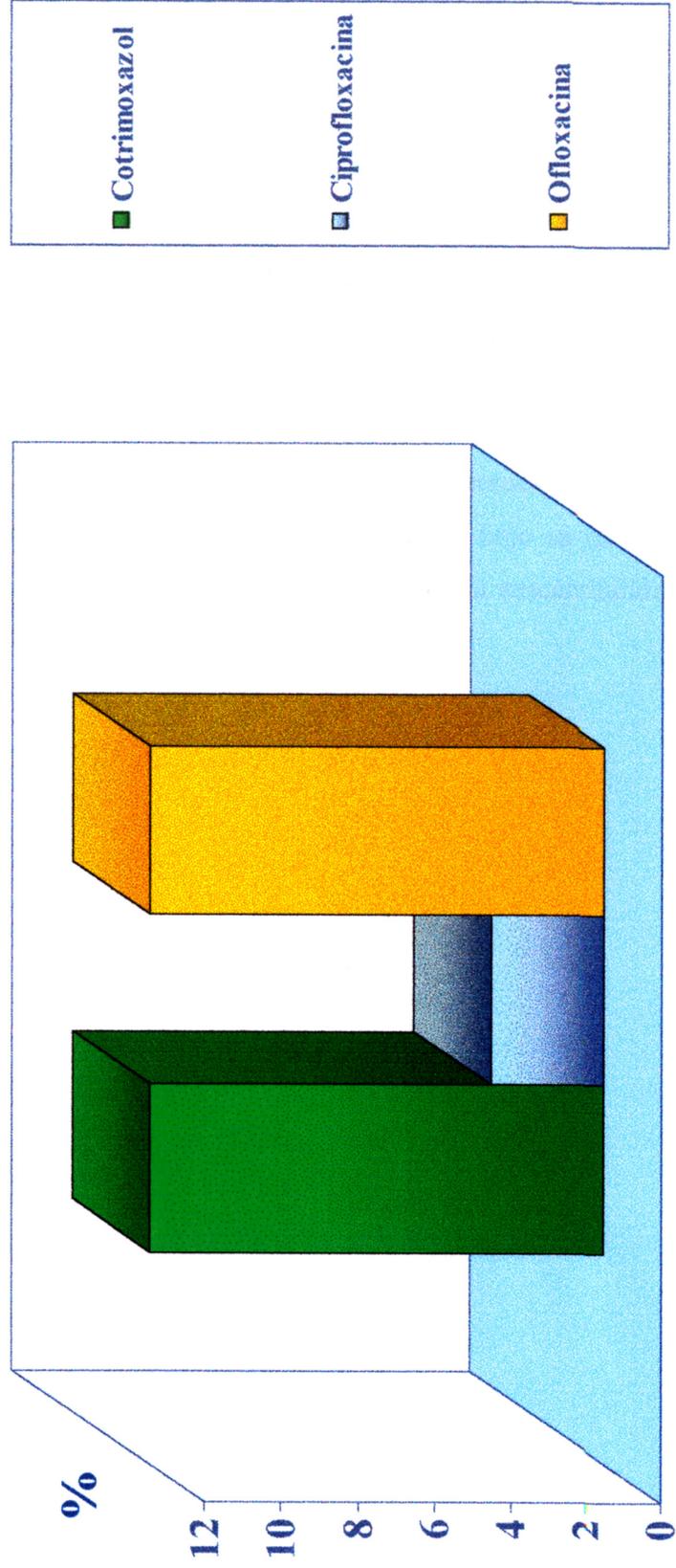


GRÁFICO 15
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
SALMONELLA A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS
NUCLEICOS



III.5.2. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS SEROTIPOS DE SALMONELLA AISLADOS FRENTE A LOS ANTIBIOMICROBIANOS ENSAYADOS

En este apartado se analiza la susceptibilidad frente a los 14 antibiomicrobianos ensayados de los diferentes serotipos identificados, haciendo énfasis en los cuatro serotipos predominantes, es decir Entertidis, Heidelberg, Typhimurium y Virchow, cuyos resultados distribuidos en valores absolutos y porcentuales se presentan en las Tablas 23, 24, 25 y 26.

Para el resto de los serotipos encontrados, es decir Kentucky, Thompson, Bovismorbificans, Hadar, Infantis, Munchen y Newport, al ser bajo su número de aislamientos se presenta únicamente la distribución absoluta de la susceptibilidad de los mismos.

III.5.2.1. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LA *SALMONELLA ENTERITIDIS*

En la Tabla 23 se recoge la distribución absoluta y porcentual de los resultados de susceptibilidad de los 42 aislados de *Salmonella enteritidis* frente a los 14 antibióticos ensayados. Las mayores resistencias las presentan frente a Piperacilina, Aztreonam y Cloramfenicol.

En relación a la resistencia de los aislados de *Salmonella enteritidis* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana (Ampicilina, Amoxicilina/clavulánico, Piperacilina, Imipenem, Aztreonam y Cefazolina), se observa que en este grupo las mayores resistencias se presentan frente a Aztreonam (54,8%) y Piperacilina (47,6%), encontrando alta sensibilidad frente a Cefazolina, Amoxicilina/clavulánico y Ampicilina (resistencias de 2,4%, 4,8% y 7,1% respectivamente).

En relación a la resistencia de los aislados de *Salmonella enteritidis* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, es decir aminoglucósidos testados, Tetraciclina y Cloramfenicol, el antibiótico menos efectivo es el Cloramfenicol (resistencia 35,7%), seguido por la Tetraciclina (9,5% de resistencia). Este serotipo mostró alta sensibilidad a los aminoglucósidos para los que los porcentajes de resistencia estuvieron por debajo de 3%.

Los porcentajes de resistencia de los aislados de *Salmonella enteritidis* a inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos se reflejan en la Tabla 23, observándose resistencia sólo en el caso de la Ofloxacina (19%).

Tabla 23. Susceptibilidad antimicrobiana de los 42 aislados de *Salmonella enteritidis*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES		RESISTENTES	
	Nº	%	Nº	%
Ampicilina	39	92,9	3	7,1
Amox/clavulánico	40	95,2	2	4,8
Piperacilina	22	52,4	20	47,6
Imipenem	35	83,3	7	16,7
Aztreonam	19	45,2	23	54,8
Cefazolina	41	97,6	1	2,4
Amikacina	42	100,0	0	0,0
Gentamicina	41	97,6	1	2,4
Tobramicina	42	100,0	0	0,0
Tetraciclina	38	90,5	4	9,5
Cloramfenicol	27	64,3	15	35,7
Cotrimoxazol	42	100,0	0	0,0
Ciprofloxacina	42	100,0	0	0,0
Ofloxacina	34	81,0	8	19,0

GRÁFICO 16
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. ENTERITIDIS* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA**
PARED BACTERIANA

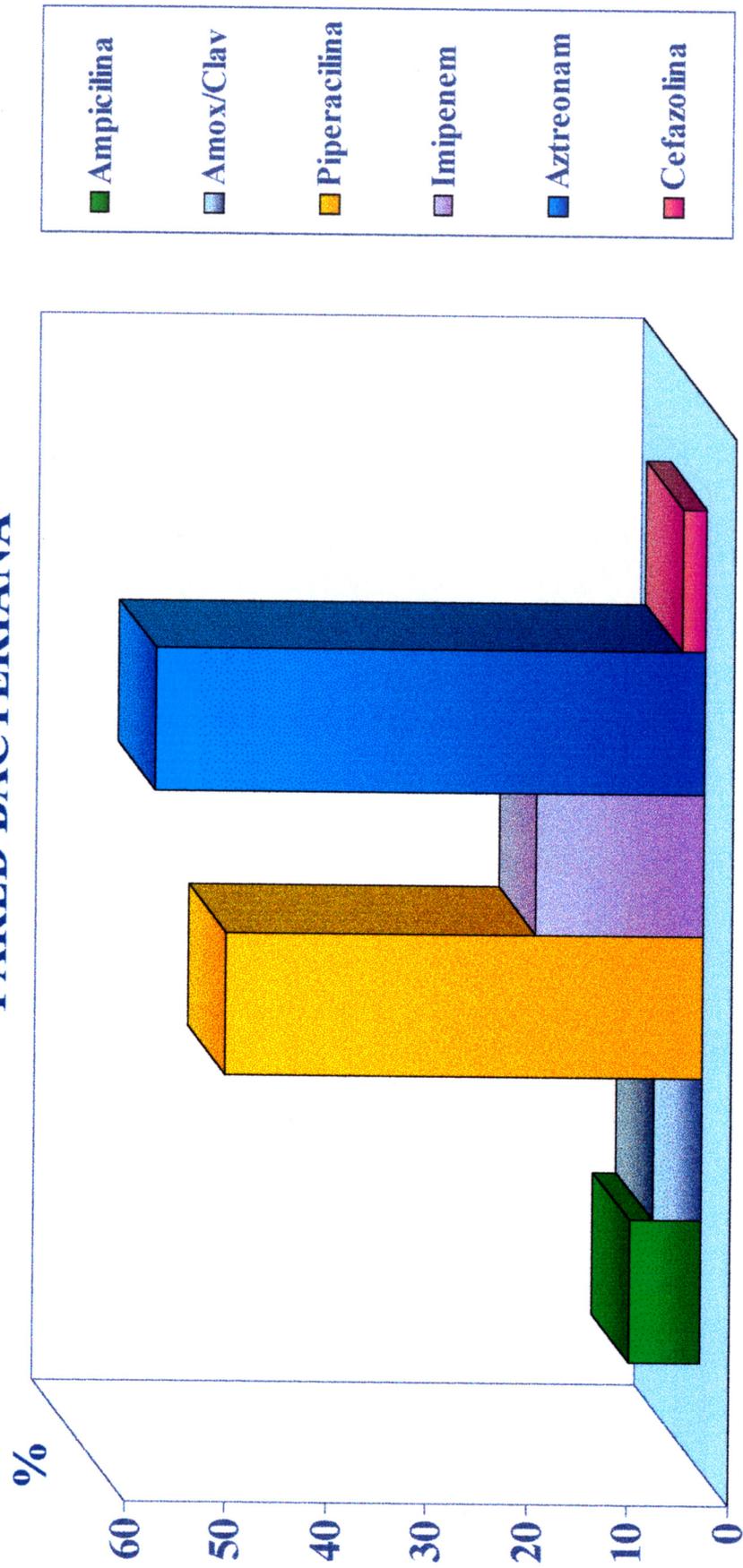


GRÁFICO 17
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. ENTERITIDIS* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE**
PROTEÍNAS

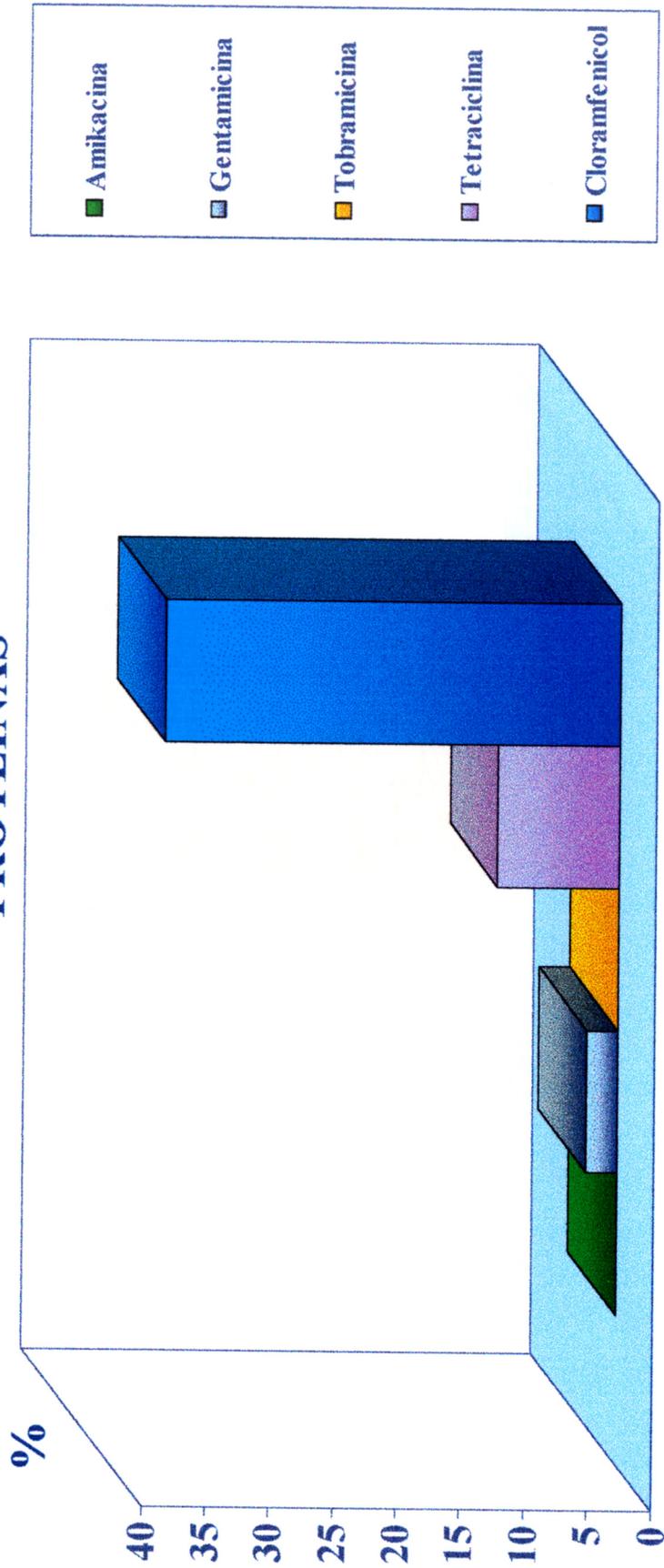
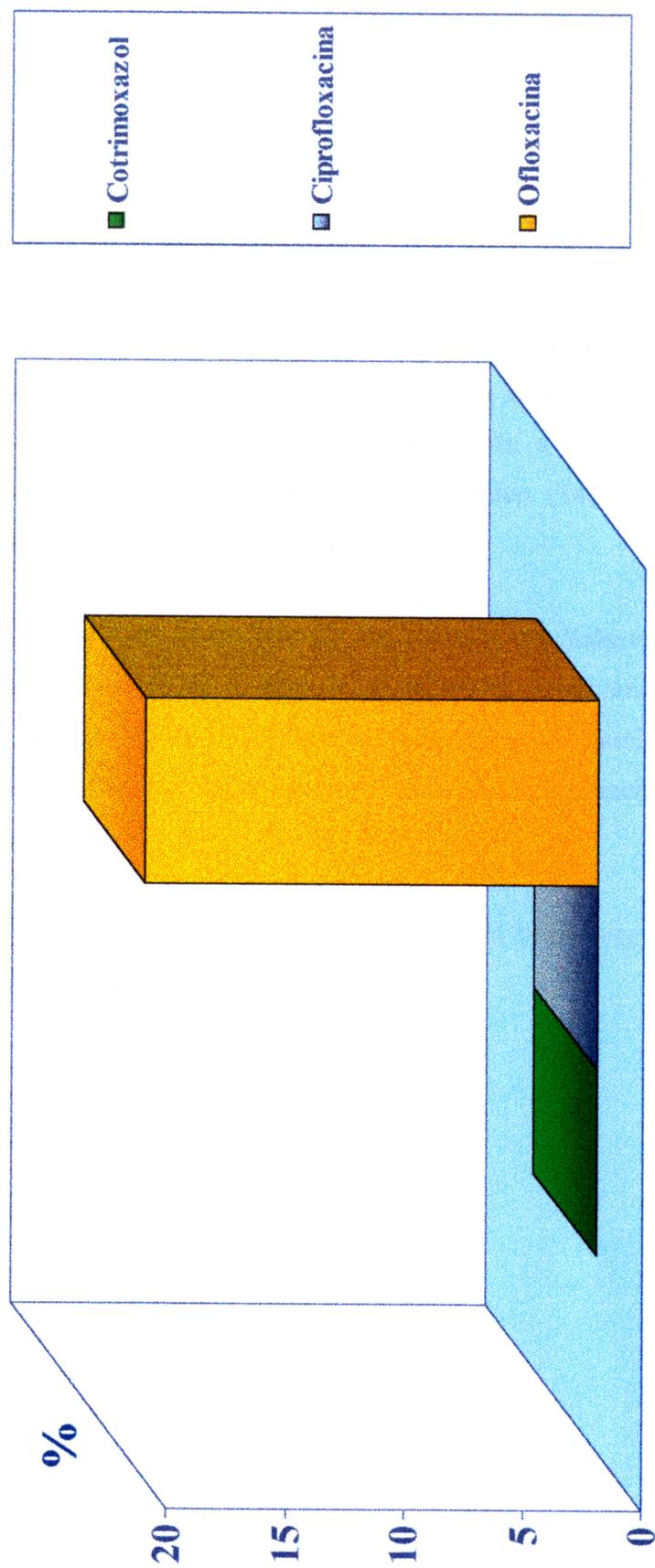


GRÁFICO 18
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
S. ENTERITIDIS A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS
NUCLEICOS



III.5.2.2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LA *SALMONELLA HEIDELBERG*

En la Tabla 24 se recoge la distribución absoluta y porcentual de los resultados de susceptibilidad de los 7 aislados de *Salmonella heidelberg* frente a los 14 antimicrobianos ensayados. Se observa que las mayores resistencias se presentan frente a Cefazolina, Tetraciclina y Tobramicina.

Se muestra la resistencia expresada en porcentajes de los aislados de *Salmonella heidelberg* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, visualizándose las resistencias más altas frente a Cefazolina (71,4%), seguido de Ampicilina (28,6%) y Amoxicilina/clavulánico (14,3%). Al resto de los antibióticos del grupo no se presentaron resistencias.

En relación a los aislados de *Salmonella heidelberg* frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, se observan resistencias frente a la Tetraciclina (42,9%), Tobramicina (28,6%) y Gentamicina (14,3%). En los 7 aislados de *S. heidelberg* no se encontró resistencia a Amikacina y Cloramfenicol.

Tampoco se encontró resistencia de los aislados de *Salmonella heidelberg* a inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.

Tabla 24. Susceptibilidad antimicrobiana de los 7 aislados de *Salmonella heidelberg*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES		RESISTENTES	
	Nº	%	Nº	%
Ampicilina	5	71,4	2	28,6
Amox/clavulánico	6	85,7	1	14,3
Piperacilina	7	100,0	0	0,0
Imipenem	7	100,0	0	0,0
Aztreonam	7	100,0	0	0,0
Cefazolina	2	28,6	5	71,4
Amikacina	7	100,0	0	0,0
Gentamicina	6	85,7	1	14,3
Tobramicina	5	71,4	2	28,6
Tetraciclina	4	57,1	3	42,9
Cloramfenicol	7	100,0	0	0,0
Cotrimoxazol	7	100,0	0	0,0
Ciprofloxacina	7	100,0	0	0,0
Ofloxacina	7	100,0	0	0,0

GRÁFICO 19
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
S. HEIDELBERG A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA
PARED BACTERIANA

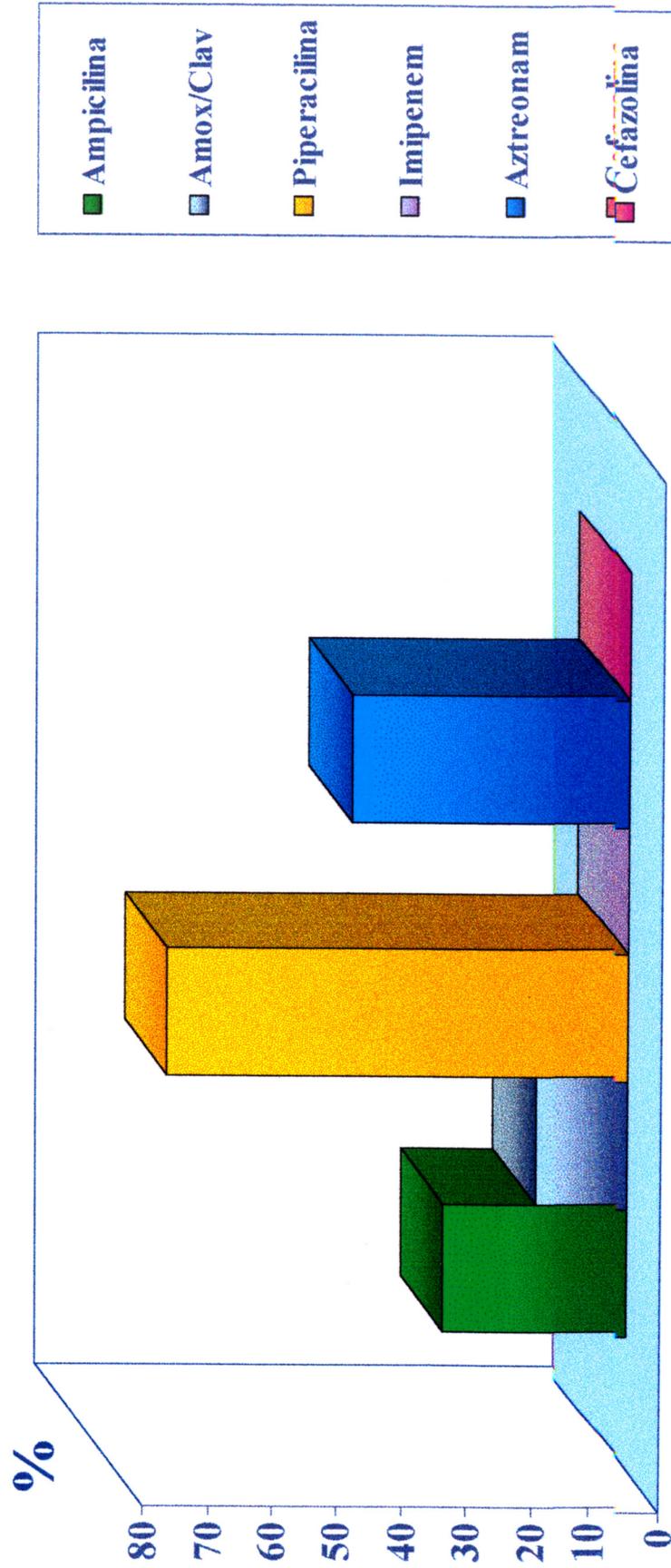
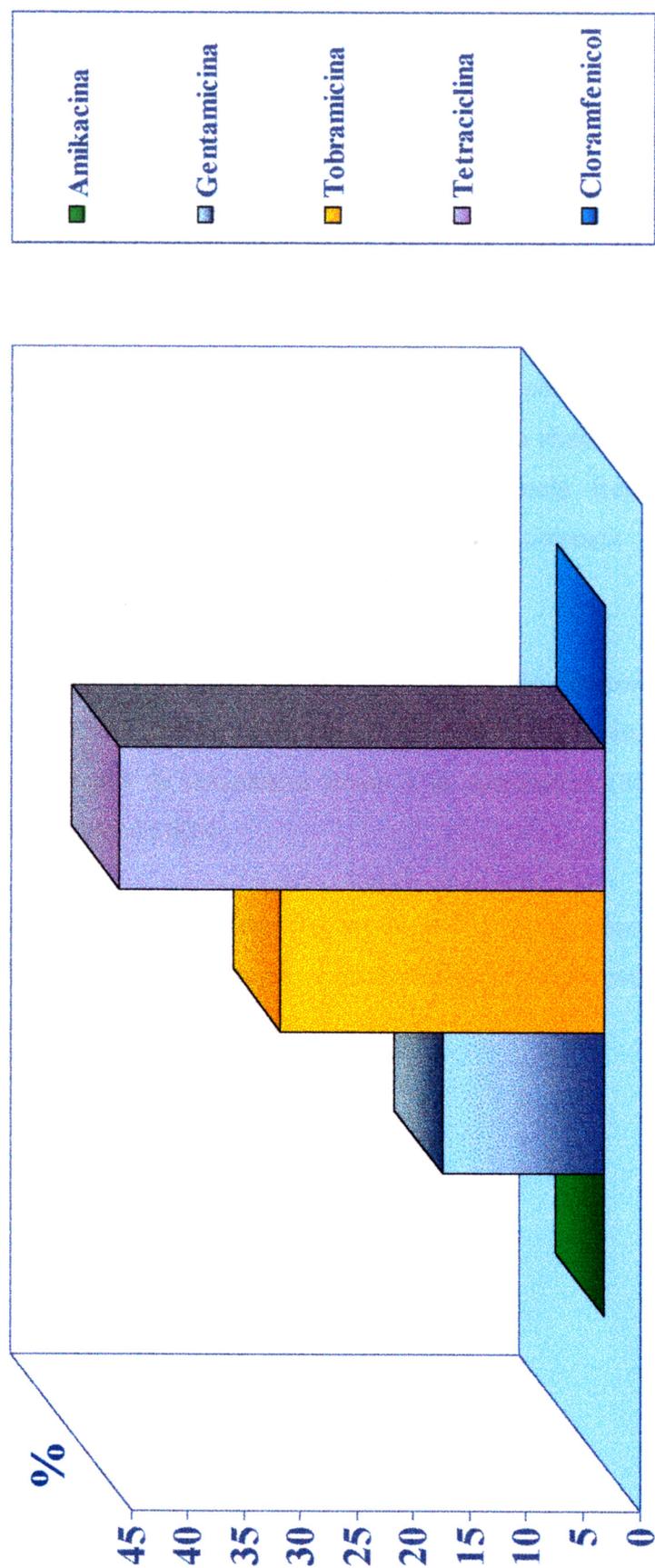


GRÁFICO 20
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. HEIDELBERG* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE**
PROTEÍNAS



III.5.2.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LA *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM*

En la Tabla 25 se presenta la distribución absoluta y porcentual de los resultados de susceptibilidad de los 5 aislados de *Salmonella typhimurium* frente a los 14 antimicrobianos ensayados. Se observa que el total de los aislamientos de este serotipo es resistente a la Ampicilina, Piperacilina y Cefazolina, siendo por otra parte totalmente sensibles a Ofloxacina.

En relación a los aislados de *Salmonella typhimurium*, frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, se aprecia un 100% de resistencia frente a Ampicilina, Piperacilina y Cefazolina, seguido de un 80% de resistencia a la Amoxicilina/clavulánico.

En la Tabla 25 se observa la resistencia de los aislados de *Salmonella typhimurium* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, observándose resistencias los más altos porcentajes de resistencia frente a la Amikacina (80%), Tetraciclina y Cloramfenicol, ambos con 60%.

En los 5 aislados de *Salmonella typhimurium* no se encontró resistencia a Ofloxacina, mientras que frente a Ciprofloxacina y Cotrimoxazol se obtuvo en ambos casos un 20%.

Tabla 25. Susceptibilidad antimicrobiana de los 5 aislados de *Salmonella typhimurium*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES		RESISTENTES	
	Nº	%	Nº	%
Ampicilina	0	0,0	5	100
Amox/clavulánico	1	20	4	80
Piperacilina	0	0,0	5	100
Imipenem	4	80	1	20
Aztreonam	4	80	1	20
Cefazolina	0	0,0	5	100
Amikacina	1	20	4	80
Gentamicina	4	80	1	20
Tobramicina	3	60	2	40
Tetraciclina	2	40	3	60
Cloramfenicol	2	40	3	60
Cotrimoxazol	4	80	1	20
Ciprofloxacina	4	80	1	20
Ofloxacina	5	100	0	0,0

GRÁFICO 21
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. TYPHIMURIUM* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA**
PARED BACTERIANA

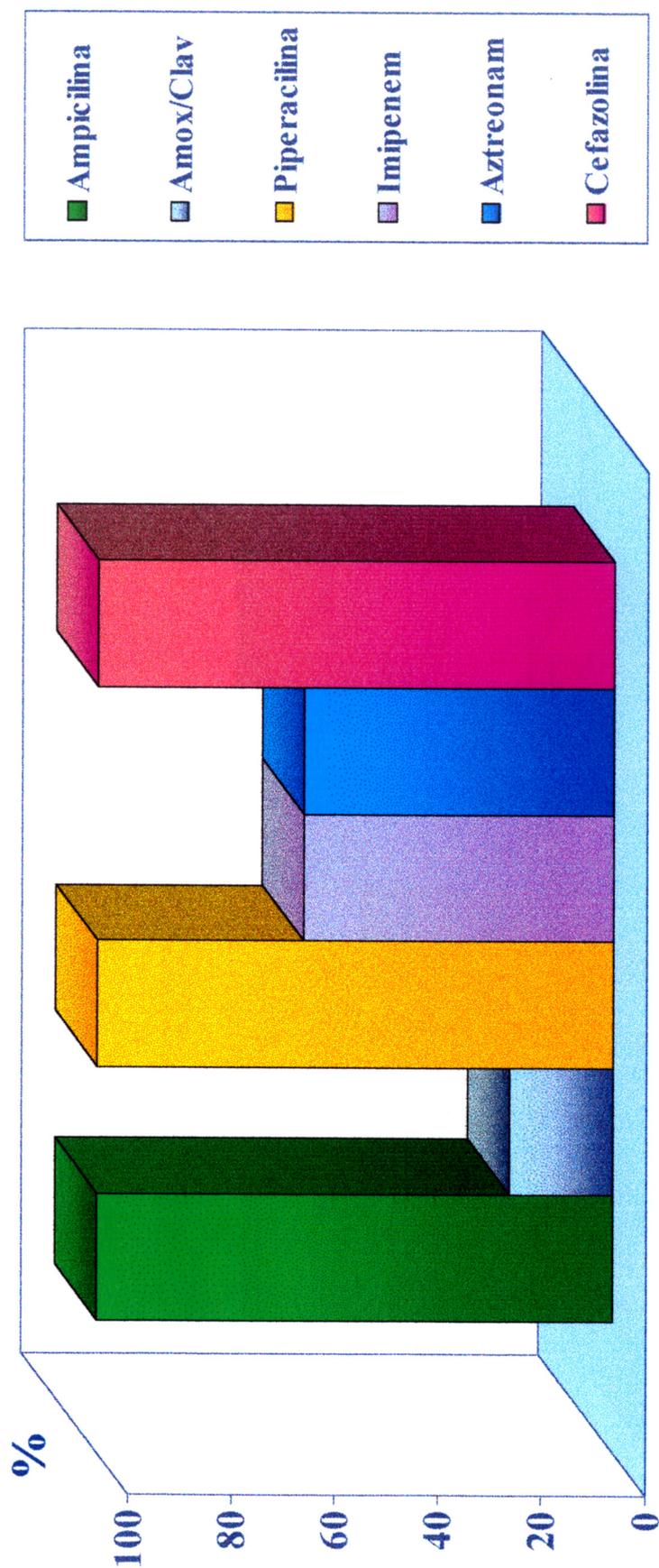


GRÁFICO 22
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. TYPHIMURIUM* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE**
PROTEÍNAS

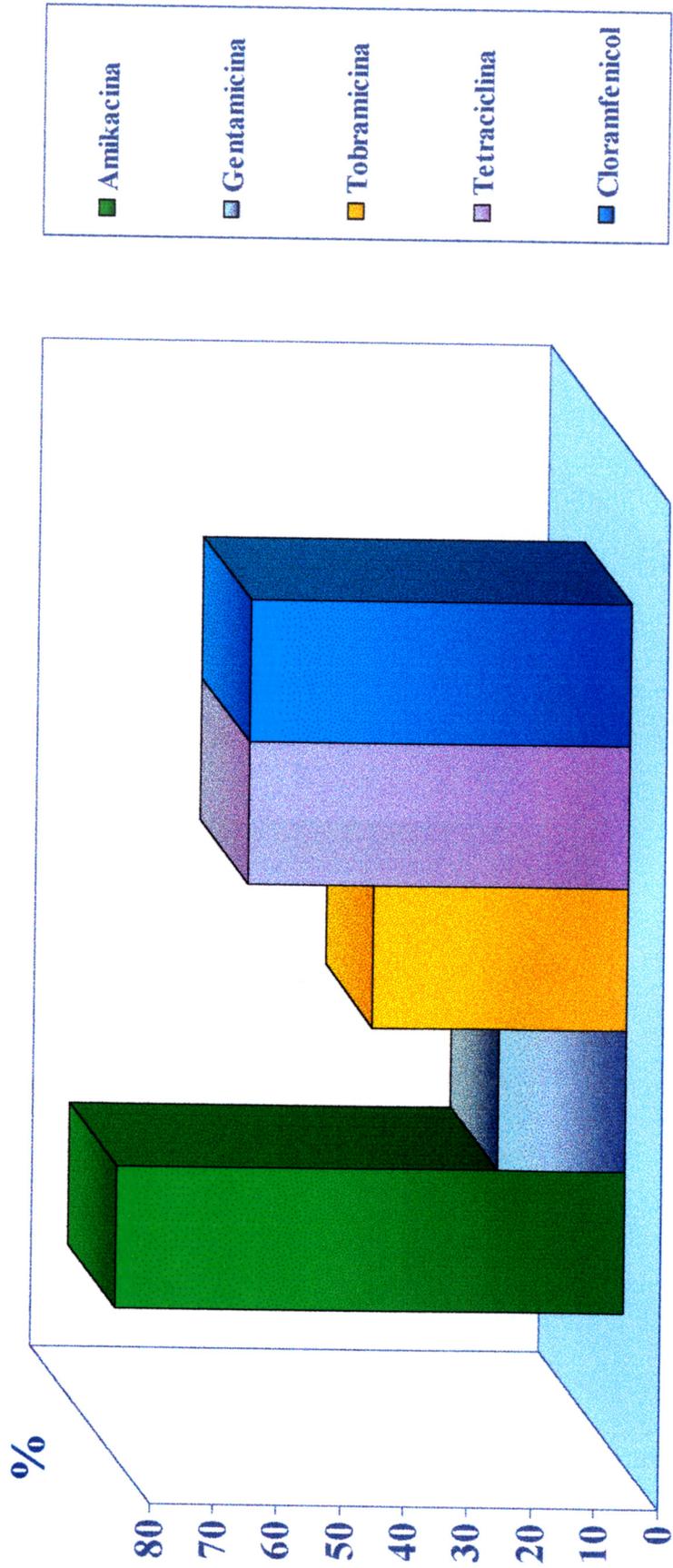
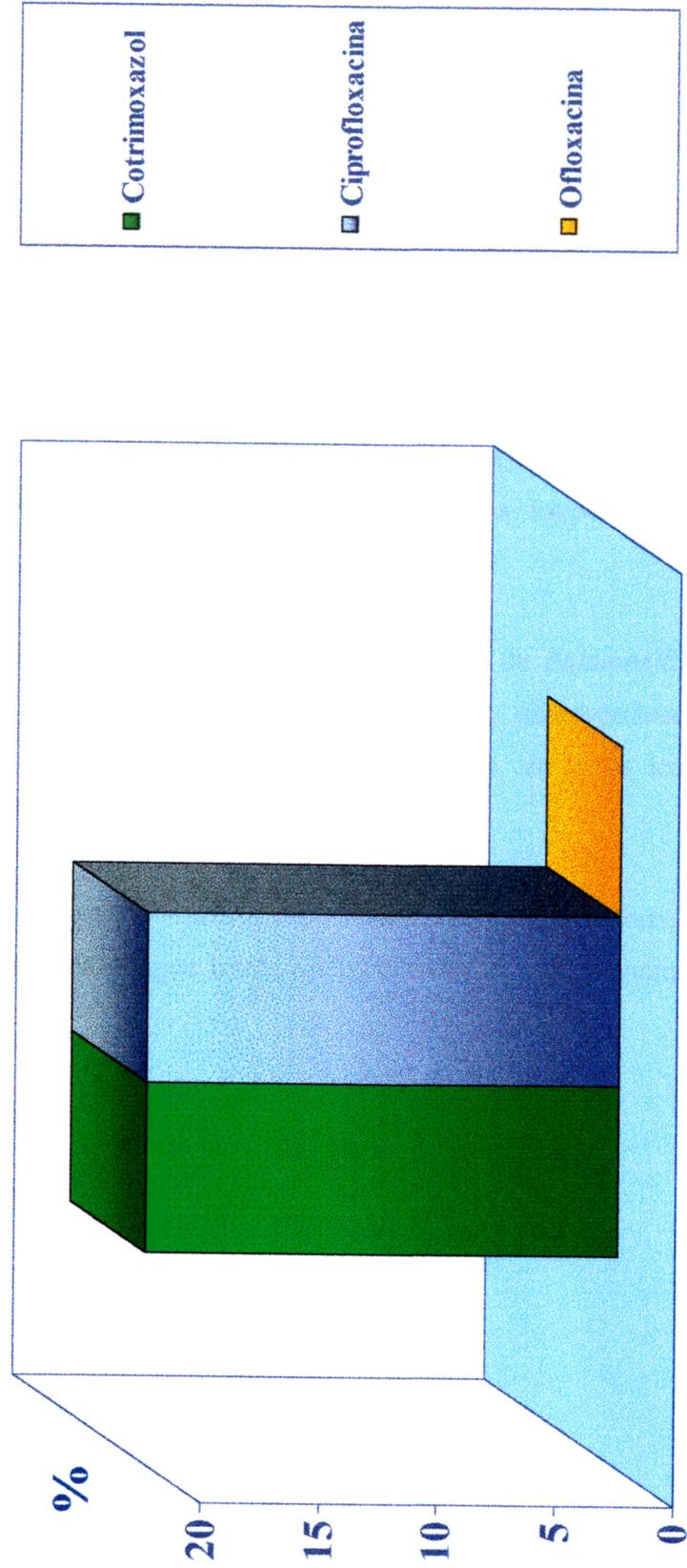


GRÁFICO 23
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. TYPHIMURIUM* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE**
ÁCIDOS NUCLEICOS



III.5.2.4. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LA *SALMONELLA VIRCHOW*

En la Tabla 26 se presenta la distribución absoluta y porcentual de los resultados de susceptibilidad de los 4 aislados de *Salmonella virchow* frente a los 14 antimicrobianos ensayados, observándose mayores resistencias frente a la Ampicilina y Cefazolina.

En relación a los aislados de *Salmonella virchow* frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, se puede apreciar un 50% de resistencia tanto para a la Ampicilina, como para la Cefazolina. No se observa resistencia a Imipenem y Aztreonam.

En la tabla 26 se observa la resistencia de los aislados de *Salmonella virchow* a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, observándose resistencias sólo frente a la Amikacina, Tetraciclina y Tobramicina, en todos los casos de un 25%.

Los aislados de *Salmonella virchow* presentaron resistencia a Cotrimoxazol en la mitad de los casos (50%), mientras que frente a Ciprofloxacina y Ofloxacina son todos sensibles.

**Tabla 26. Susceptibilidad antimicrobiana de los 4 aislados de
Salmonella virchow**

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES		RESISTENTES	
	Nº	%	Nº	%
Ampicilina	2	50	2	50
Amox/clavulánico	3	75	1	25
Piperacilina	3	75	1	25
Imipenem	4	100	0	0,0
Aztreonam	4	100	0	0,0
Cefazolina	2	50	2	50
Amikacina	3	75	1	25
Gentamicina	4	100	0	0,0
Tobramicina	3	75	1	25
Tetraciclina	3	75	1	25
Cloramfenicol	4	100	0	0,0
Cotrimoxazol	2	50	2	50
Ciprofloxacina	4	100	0	0,0
Ofloxacina	4	100	0	0,0

GRÁFICO 24
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
S. VIRCHOW A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA
PARED BACTERIANA

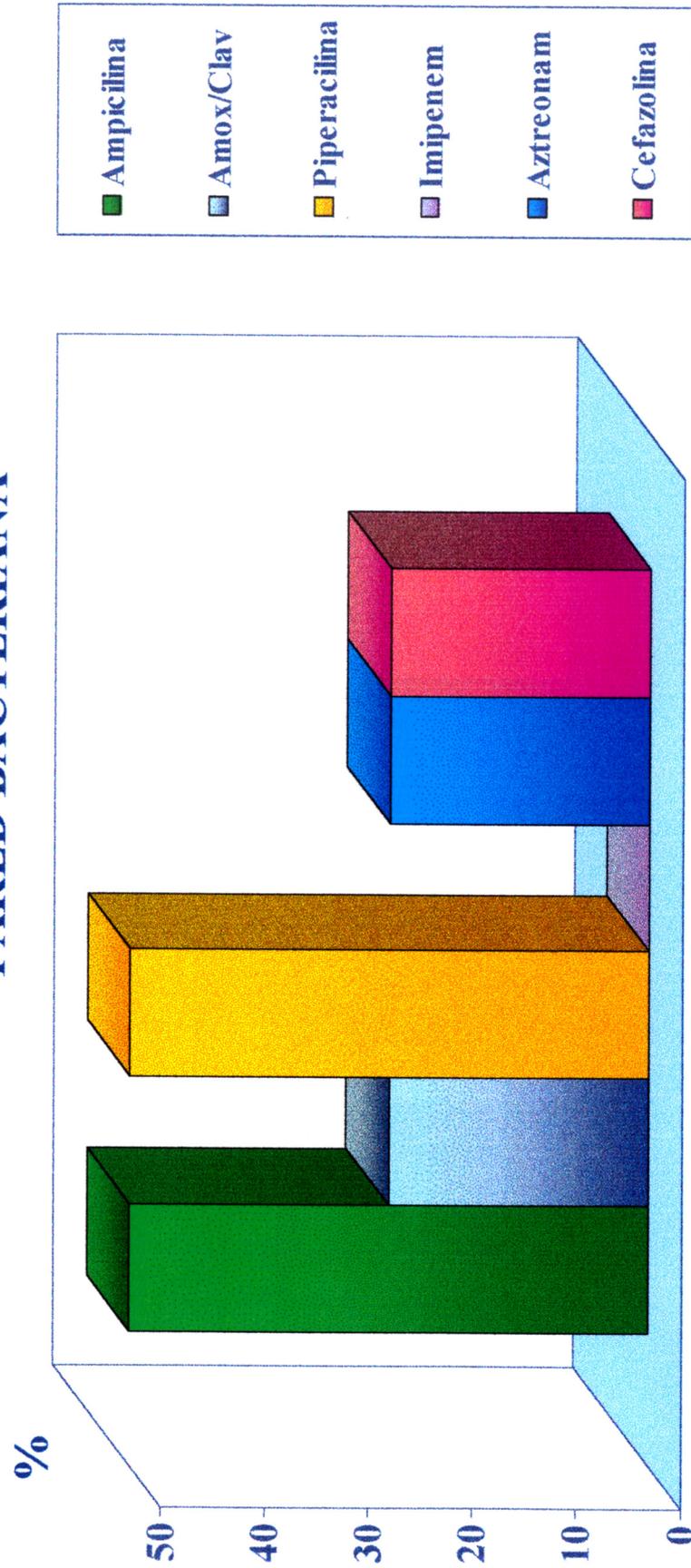


GRÁFICO 25
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. VIRCHOW* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS**

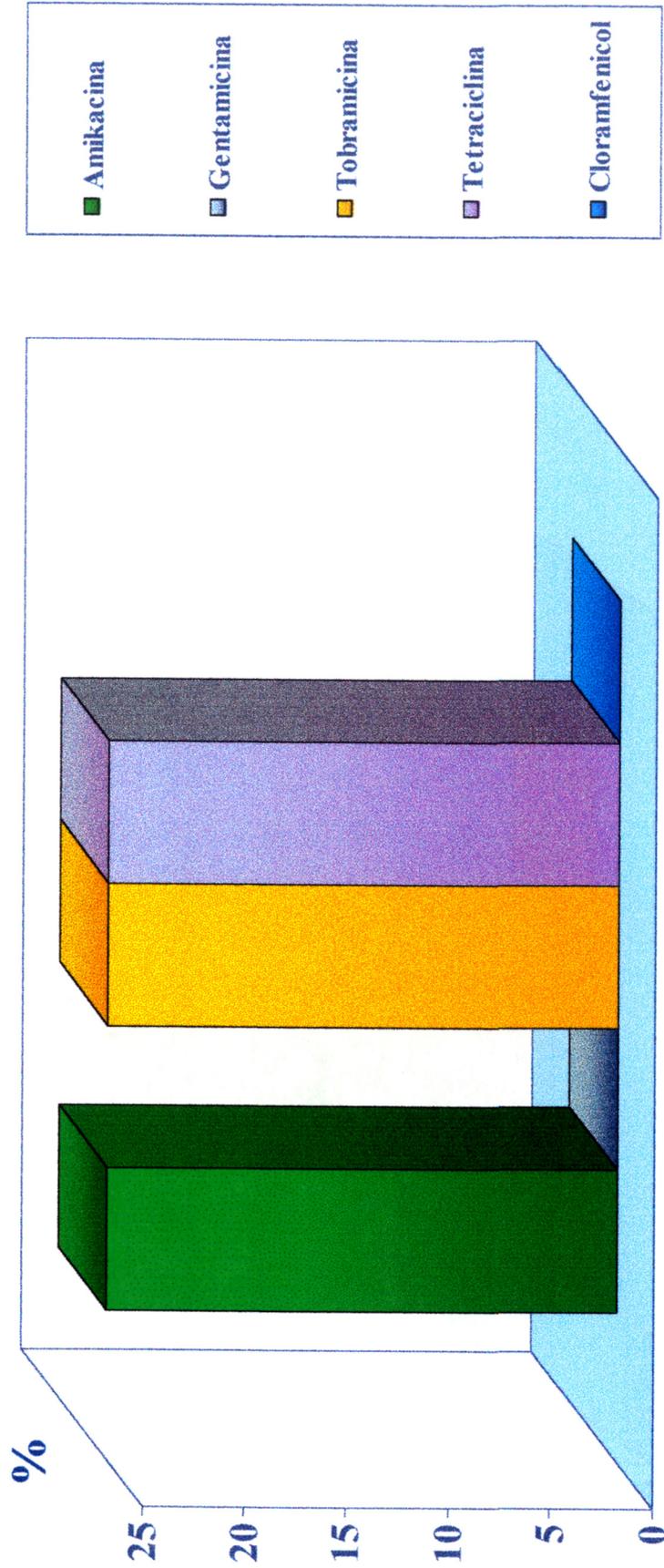
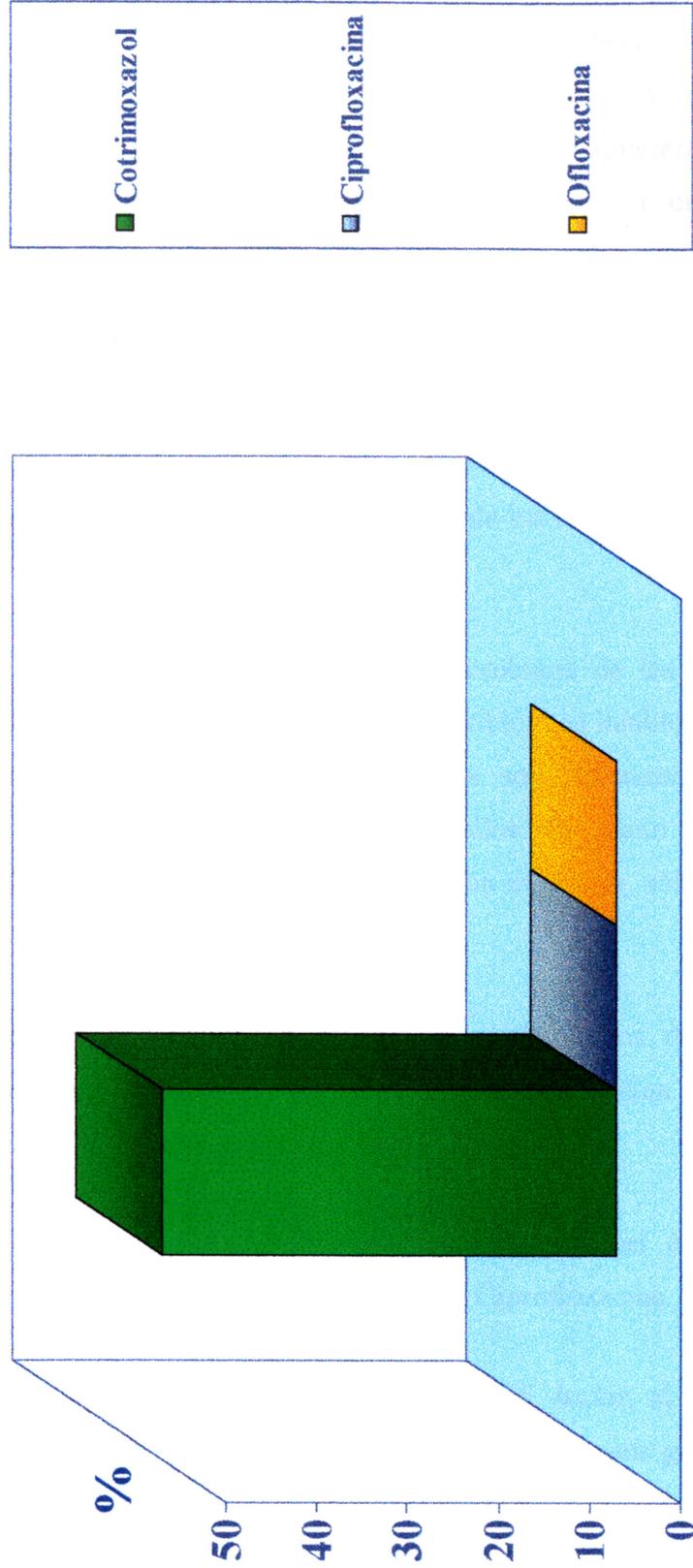


GRÁFICO 26
RESISTENCIA DE LOS AISLADOS DE
***S. VIRCHOW* A INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS**
NUCLEICOS



III.5.2.5. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE OTROS SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS

En este estudio, además de los serotipos Enteritidis, Heidelberg, Typhimurium y Virchow, se aislaron con menor frecuencia otros serotipos de *Salmonella*. Estos son Kentucky y Thompson, ambos con dos aislamientos y Bovismorbificans, Hadar, Infantis, Munchen y Newport, todos con un único aislamiento.

En virtud de la baja frecuencia de aislamiento de dichos serotipos se considera inadecuada la presentación gráfica de sus porcentajes de resistencia frente a los 14 antimicrobianos ensayados, por lo que sólo se presentan los valores absolutos de aislamientos sensibles y resistentes para cada uno de los mismos en las Tablas 27 a 33.

En la Tabla 27 se presenta la susceptibilidad antimicrobiana de los dos aislamientos de *S. kentucky* observándose, con respecto a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, que los dos aislados son resistentes al Aztreonam, mientras frente a la Piperacilina lo es sólo uno de ellos. En cuanto a los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas, la situación es similar, sólo un aislamiento es resistente frente a Tetracilina y Cloramfenicol.

La Tabla 28 muestra la susceptibilidad de los dos aislamientos de *S. thompson*, en los que encontramos resistencias de ambos ante la Cefazolina y la Tetraciclina y de sólo uno frente Aztreonam.

En la Tabla 29 se observa la susceptibilidad antimicrobiana del único aislamiento de *S. bovisorbificans*, el cual es resistente sólo a la Ciprofloxacina.

La Tabla 30 expone la susceptibilidad del aislamiento de *S. hadar*, el cual mostró resistencias frente a tres de los antimicrobianos testados, uno de cada grupo de los estudiados, estos son la Cefazolina, Tetraciclina y Cotrimoxazol.

La Tabla 31 presenta el antibiograma del aislamiento de *S. infantis* que no presenta resistencia a los antibióticos ensayados.

En la Tabla 32 se muestra la susceptibilidad del aislamiento de *S. munchei*, que presenta multiresistencia a antimicrobianos, en este caso a tres inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, es decir a la Ampicilina, Piperacilina y Cefazolina, así como a dos antimicrobianos inhibidores de la síntesis de las proteínas, Amikacina y Tetraciclina.

En la Tabla 33 se observa la susceptibilidad del aislamiento de *S. newport* a los antimicrobianos probados, siendo éste resistente a cuatro de ellos, a la Amoxicilina/clavulánico, perteneciente al grupo de los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, a la Amikacina y la Tobramicina, ambos del grupo de los inhibidores de la síntesis de las proteínas y por último al Cotrimoxazol (inhibidor de la síntesis de los ácidos nucleicos).

Tabla 27. Susceptibilidad antimicrobiana de la *Salmonella kentucky*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	2	0
Amox/clavulánico	2	0
Piperacilina	1	1
Imipenem	2	0
Aztreonam	0	2
Cefazolina	2	0
Amikacina	2	0
Gentamicina	2	0
Tobramicina	2	0
Tetraciclina	1	1
Cloramfenicol	1	1
Cotrimoxazol	2	0
Ciprofloxacina	2	0
Ofloxacina	2	0

Tabla 28. Susceptibilidad antimicrobiana de la *Salmonella thompson*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	2	0
Amox/clavulánico	2	0
Piperacilina	2	0
Imipenem	2	0
Aztreonam	1	1
Cefazolina	0	2
Amikacina	2	0
Gentamicina	2	0
Tobramicina	2	0
Tetraciclina	0	2
Cloramfenicol	2	0
Cotrimoxazol	2	0
Ciprofloxacina	2	0
Ofloxacina	2	0

Tabla 29. Susceptibilidad antimicrobiana de la *Salmonella bovis* moribificans

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	1	0
Amox/clavulánico	1	0
Piperacilina	1	0
Imipenem	1	0
Aztreonam	1	0
Cefazolina	1	0
Amikacina	1	0
Gentamicina	1	0
Tobramicina	1	0
Tetraciclina	1	0
Cloramfenicol	1	0
Cotrimoxazol	1	0
Ciprofloxacina	0	1
Ofloxacina	1	0

Tabla 30. Susceptibilidad antimicrobiana de la *Salmonella hadar*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	1	0
Amox/clavulánico	1	0
Piperacilina	1	0
Imipenem	1	0
Aztreonam	1	0
Cefazolina	0	1
Amikacina	1	0
Gentamicina	1	0
Tobramicina	1	0
Tetraciclina	0	1
Cloramfenicol	1	0
Cotrimoxazol	0	1
Ciprofloxacina	1	0
Ofloxacina	1	0

Tabla 31. Susceptibilidad antimicrobiana de *S. infantis*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	1	0
Amox/clavulánico	1	0
Piperacilina	1	0
Imipenem	1	0
Aztreonam	1	0
Cefazolina	1	0
Amikacina	1	0
Gentamicina	1	0
Tobramicina	1	0
Tetraciclina	1	0
Cloramfenicol	1	0
Cotrimoxazol	1	0
Ciprofloxacina	1	0
Ofloxacina	1	0

Tabla 32. Susceptibilidad antimicrobiana de la *Salmonella muenchen*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	0	1
Amox/clavulánico	1	0
Piperacilina	0	1
Imipenem	1	0
Aztreonam	1	0
Cefazolina	0	1
Amikacina	0	1
Gentamicina	1	0
Tobramicina	1	0
Tetraciclina	0	1
Cloramfenicol	1	0
Cotrimoxazol	1	0
Ciprofloxacina	1	0
Ofloxacina	1	0

Tabla 33. Susceptibilidad antimicrobiana de la *Salmonella newport*

ANTIBIÓTICOS	SENSIBLES	RESISTENTES
Ampicilina	1	0
Amox/clavulánico	0	1
Piperacilina	1	0
Imipenem	1	0
Aztreonam	1	0
Cefazolina	1	0
Amikacina	0	1
Gentamicina	1	0
Tobramicina	0	1
Tetraciclina	1	0
Cloramfenicol	1	0
Cotrimoxazol	0	1
Ciprofloxacina	1	0
Ofloxacina	1	0

IV. DISCUSIÓN

V.1. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA*

IV.1.1. AISLAMIENTO GLOBAL DE *SALMONELLA*

En nuestro estudio, de un total de 406 muestras de pollo congelado, obtuvimos un 16,5% de aislamientos de *Salmonella*.

A la hora de comparar nuestros resultados con los de otros estudios realizados en nuestro país, no hemos encontrado datos referentes al aislamiento de *Salmonella* de pollos importados para el consumo humano en España.

En un trabajo realizado en la Comunidad Autónoma de Madrid por Manso et al. (1987), en el que se analizaron 51 muestras de pollos refrigerados sin especificar su procedencia, obtuvo un porcentaje de aislamiento del 21,5%, ligeramente superior al nuestro.

En el caso de datos de muestras de origen no humano, conocemos las publicaciones de Usera y Echeita, pertenecientes al Instituto de Salud Carlos III. Los resultados a que se refieren, corresponden a muestras enviadas al Centro Nacional de Referencia de *Salmonella* de Majadahonda, desde distintos puntos de la geografía española, sin que en ningún caso se especifique si son de producción local o importación.

Entre 1983-1987 la presencia de *Salmonella* en carne de aves, de origen no especificado, fue de 30,5% (Usera y Echeita, 1989), entre 1988-1992 de 22,6% (Usera et al., 1995) y en el período comprendido entre 1993-1996 llegó a alcanzar su mínimo representado por un 20,8% (Echeita et al., 1999).

En un estudio realizado en nuestro departamento con muestras de muslos de pollos frescos la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* fue de 21,4%.

Como podemos observar, existe una clara tendencia a la disminución en el porcentaje de *Salmonella* aisladas de muestras de aves en nuestro país. El porcentaje

de *Salmonella* obtenida por nosotros en los pollos importados es inferior a los informados por los citados autores en todos los períodos mencionados.

Como se ha señalado en el capítulo de Revisión y Antecedentes, la presencia de *Salmonella* en los pollos, es variable en las diferentes etapas del procesamiento del mismo, hasta su comercialización y distribución. Según una revisión realizada por Bryan y Doyle (1995) puede aislarse *Salmonella* durante todo este proceso entre un 2-100%, siendo la prevalencia media de un 30%, porcentaje que prácticamente duplica al 16,5% obtenido en este estudio.

IV.1.2. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN PAÍS DE ORIGEN

Si analizamos los aislamientos de *Salmonella* por países de procedencia de las muestras, observamos que en las procedentes de Francia, se encontró la frecuencia más alta de *Salmonella* (25%) de este estudio, seguido de las muestras de Brasil (15,2%) y por último las muestras de Estados Unidos con un 7,4%.

Las diferencias entre estos porcentajes de acuerdo al país de origen de la muestra (Brasil, Francia y Estados Unidos) se analizan mediante tablas de contingencia 2 x N (siendo N el número de países que se comparan), para la determinación del estadístico X^2 y el valor p del nivel de significación.

En primer término, al comparar en tabla de contingencia 2 x 3 (Tabla 34) las muestras estudiadas de acuerdo al origen, se obtuvo una $p= 0,05010473$, ligeramente superior al nivel de significación establecido ($p < 0,05$), por lo que el análisis de las diferencias entre los tres países no es concluyente.

Tabla 34. Análisis Estadístico de los aislamientos de *Salmonella* según país de procedencia

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	46	257	$X^2 = 5,99$ $P= 0,05010473$
Francia	19	57	
EEUU	2	25	

En segundo lugar, al estar el valor obtenido de p próximo a la significación estadística, analizamos los resultados en tablas de contingencia 2 x 2, comparando primero los resultados de Brasil frente a los de Francia, luego Brasil y Estados Unidos y finalmente Francia frente a Estados Unidos, como muestran las Tablas 35, 36 y 37 respectivamente.

Se observa que sólo en la comparación de los resultados de muestras de Brasil frente a las de Francia se obtienen diferencias significativas ($p= 0,0423211$). En el caso de muestras de Brasil y Estados Unidos las diferencias no son significativas. En las muestras de Francia y Estados Unidos el análisis no es concluyente ($p = 0,0512907$), ya que p está próximo al nivel de significación, lo que evidentemente se debe al tamaño de la muestra de Estados Unidos.

Tabla 35. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muestras de Brasil y Francia

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	46	257	$X^2 = 4,12$
Francia	19	57	$P= 0,0423211$

Tabla 36. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muestras de Brasil y Estados Unidos

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	46	257	$X^2 = 1,21$
EEUU	2	25	$P= 0,2722449$

Tabla 37. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muestras de Francia y Estados Unidos

País	+	-	Análisis Estadístico
Francia	19	57	$X^2 = 3,80$
EEUU	2	25	$P= 0,0512907$

En nuestra revisión hemos encontrado pocos trabajos sobre frecuencia de aislamiento de *Salmonella* en pollo en distintos países.

Miller et al. (1995) afirman que aproximadamente el 50% de los pollos de Estados Unidos tienen cultivos positivos para *Salmonella*.

Barnhart et al. (1991) en un estudio realizado en Georgia, Estados Unidos, donde se determinó la presencia de *Salmonella* en ovarios de gallinas en el momento del sacrificio, encontraron esta bacteria en un 76%.

Sin embargo, en los pollos analizados por nosotros, de procedencia de Estados Unidos, el porcentaje obtenido es del 7,4% muy inferior a los referidos por dichos autores.

El porcentaje encontrado por Barnhart et al. (1991) es similar al obtenido en el Reino Unido por Roberts en 1979, en muestras de pollo congelado, la mayoría producidos en el propio país y sólo seis de otros países de la Unión Europea. De estos seis, tres frescos y tres congelados, obtuvo un valor de 83,3%. Este mismo autor encuentra en 1987 un 64% en pollos congelados y 54% en pollos refrigerados (media de 59%). En 1991 estos porcentajes son de 54 y 42 respectivamente (48%) y en 1996 obtiene un 36%. Todos estos porcentajes superan a la frecuencia media de aislamiento de *Salmonella* obtenida por nosotros, sin diferenciar el país (16,5%).

En Escocia durante el bienio 1988-1989, se encontraron valores entre 27-66% en un estudio realizado por Sharp (1991) en muestras de pollo crudo en la cocina de un hospital de larga estancia, con una prevalencia media (45%) superior a la de nuestros resultados.

Por su parte, en Italia, Fantasia y Filetici (1994) manifiestan que en el período 1988-1992 el porcentaje de aislamiento de *Salmonella* en carne de pollos fue de 15,3%.

En Holanda (Van de Giessen et al., 1991) hacen un screening de la presencia de *Salmonella* en grupos de pollos, revelando que ésta se encontraba presente en el 47% de las gallinas ponedoras y en el 94% de pollos de engorde.

Desconocemos la incidencia global de *Salmonella* en pollos en Brasil y en Francia, ya que no hemos encontrado publicaciones que lo reseñen.

Dada la importancia que han tenido los huevos y la carne de aves como vehículos de infecciones alimentarias en el hombre, se han tomado medidas rigurosas para evitar la difusión de la infección en las granjas de gallinas reproductoras y ponedoras. De esta forma, por ejemplo en algunos países como Gran Bretaña, poblaciones enteras fueron destruidas entre 1989-1991 si se descubría que una gallina eliminaba *Salmonella typhimurium* o *S. enteritidis*. Después de 1991 se continuó con la eliminación en el caso de la presencia de *Salmonella enteritidis*. Se inició, a su vez, los controles de los piensos para aves y se establecieron programas de vigilancia e investigación con la participación de todas las instituciones con competencia en veterinaria, higiene de los alimentos y salud pública a fin de reducir la incidencia de salmonelosis provocada por las aves y sus huevos.

IV.1.3. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN TIPO DE MUESTRA

En este estudio hemos analizado las diferencias entre las frecuencias de aislamiento de *Salmonella* en tres tipos de muestras de pollo congelado, es decir muslos, enteros y pechugas, diferencia que para nosotros tiene interés y que es poco estudiada por otros autores.

Los muslos constituyen el tipo de muestra en el que aislamos *Salmonella* en mayor porcentaje (21,2), seguido de los pollos enteros (16,5) y por último las pechugas con 9,9.

Para analizar si las diferencias según el tipo de muestra son significativas, se aplicó un análisis estadístico mediante tablas de contingencia 2 x N (siendo N el número de tipo de muestras que se comparan) para la determinación del estadístico X^2 y el valor p del nivel de significación.

Al comparar en tabla de contingencia 2 x 3 todos los tipos de muestras estudiadas (muslos, pechugas, enteros), se obtienen diferencias significativas (Tabla 38).

Tabla 38. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* según tipo de muestra

Muestra	+	-	Análisis Estadístico
Muslos	36	134	$X^2 = 6,5$ P=0,03871130
Pechugas	12	109	
Enteros	19	96	

Para ser más exhaustivos en el análisis y determinar donde se presenta esta diferencia se realizó el análisis en tablas de contingencia 2 x 2, comparando primero los resultados de muslos frente a pechuga, luego muslos con enteros y por último pechugas con enteros (Tablas 39, 40 y 41 respectivamente), revelando que la

diferencia entre los resultados viene dada por el hallazgo de la significativa mayor presencia de *Salmonella* en muslos que en pechugas.

Tabla 39. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muslos y pechugas

Muestra	+	-	Análisis Estadístico
Muslos	36	134	$X^2 = 6,51$
Pechugas	12	109	$P=0,0107534$

Tabla 40. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muslos y enteros

Muestra	+	-	Análisis Estadístico
Muslos	36	134	$X^2 = 0,95$
Enteros	19	96	$P=0,3286242$

Tabla 41. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en pechugas y enteros

Muestra	+	-	Análisis Estadístico
Pechugas	12	109	$X^2 = 2,25$
Enteros	19	96	$P=0,1332738$

Es escasa la bibliografía encontrada sobre la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* en pollos, diferenciando distintas partes del mismo.

En un estudio realizado por Plummer y colaboradores (1995) en el Reino Unido en diferentes presentaciones de pollo fresco y congelado, encontraron *Salmonella* en pollos congelados, un 32%, 40% y 7,6% en muestras de enteros, pechugas y muslos respectivamente. Nosotros, también en pollos congelados,

obtuvimos valores muy inferiores en los pollos enteros (16,5%) y pechugas (9,9%) y sin embargo, en muslos se encontró en un mayor porcentaje que lo señalado por estos autores (21,6%). En pollos frescos, estos investigadores encontraron diferencias por tipo de muestra, 26,3% en entero, 26,6% en pechuga y 0% en muslos, muy diferente a lo obtenido en pollos congelados, tanto por el propio autor como por nosotros.

Parecen más lógicos nuestros resultados en relación a las muestras de muslos, ya que para la obtención de esta presentación comercial existe una mayor manipulación durante la maniobra de corte, con la posibilidad de que ocurra contaminación cruzada.

IV.1.4. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN UNIDAD ANALÍTICA Y TIPO DE MUESTRA

Esta diferenciación por unidad analítica, piel y carne, sólo se realizó en el caso de las muestras de pollo entero y muslos, puesto que las pechugas, como se ha señalado, se comercializan sin piel.

En los pollos enteros, obtuvimos 17 aislados en la piel y 6 en el músculo. Para analizar si las diferencias de los hallazgos entre la piel y músculo son significativas, se aplicó un análisis estadístico mediante tablas de contingencia 2 x 2 (Tabla 42) para la determinación del estadístico X^2 y el valor p del nivel de significación, obteniéndose que el aislamiento de *Salmonella* es significativamente mayor en el caso de la piel, lo que parece lógico, ya que aparte de la posibilidad de presencia de *Salmonella* de origen endógeno en el pollo hay que considerar los riesgos de contaminación cruzada que se presentan durante el procesamiento y manipulación posterior.

Tabla 42. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en pollos enteros según unidad analítica

Unidad Analítica	+	-	Análisis Estadístico
Piel	17	98	$X^2 = 5,85$ P=0,0156177
Músculo	6	109	

En los muslos, se obtuvieron 30 aislados en la piel y 20 en el músculo. Para el análisis estadístico de la contaminación en piel y en músculo en este tipo de muestra, se realizó una tabla de contingencia 2 x 2, no obteniéndose diferencias significativas (Tabla 43).

Tabla 43. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muslos enteros según unidad analítica

Unidad Analítica	+	-	Análisis Estadístico
Piel	30	140	$X^2 = 2,34$
Músculo	20	150	$P=0,1256995$

No hemos encontrado bibliografía sobre aislamientos de *Salmonella* en pollos, diferenciando piel y músculo.

Nosotros hemos realizado un estudio en 70 muslos de pollo frescos procedentes de granjas de Tenerife, diferenciando piel y músculo, en el que obtuvimos porcentajes del 12,9 y 17,1 respectivamente (Hernández et al., 1999). En estos resultados observamos que el aislamiento es ligeramente superior en el músculo que en la piel, a diferencia de las muestras del presente estudio, lo que puede tener su explicación en uno o más de los siguientes factores: 1) que al ser mayor la temperatura de conservación de los pollos frescos, se facilite la multiplicación de los microorganismos y diseminación hacia zonas más profundas; 2) a la presencia de una mayor carga microbiana de las aves vivas, lo que facilitaría la producción de bacteriemia, y por tanto la adquisición endógena de *Salmonella*, inducida por el estrés durante el transporte y sacrificio de las aves y 3) a que las aves hayan sido sometidas a un proceso de escaldado con altas temperaturas y posterior prolongación del tiempo de inmersión para el enfriamiento. Esto favorecería el que los microorganismos inicialmente adheridos a la piel penetren a través de las fisuras, grietas y pliegues de la misma hasta alcanzar tejidos más profundos, en los que los enzimas bacterianos y tisulares ya han iniciado su proceso de autólisis, que también contribuyen a la presencia de microorganismos a nivel del músculo.

Todo ello sin descartar la posibilidad de que la presencia de salmonelas en el músculo, sea debida a una probable contaminación cruzada al realizarse la toma de muestra de piel.

IV.1.5. AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SEGÚN PAÍS Y TIPO DE MUESTRA

Para analizar los aislamientos de *Salmonella* por país y tipo de muestra, se realizó el cálculo del estadístico X^2 y el nivel de significación p en muslos procedentes de Brasil y Estados Unidos (Tabla 44) y enteros procedentes de Brasil y Francia (Tabla 45). Con los resultados de las muestras de pechuga, no se han realizado estos cálculos por ser todas de un mismo país (Brasil).

No hemos encontrado diferencias significativas entre el porcentaje de aislamientos en muslos procedentes de Brasil (31,2) y el de Estados Unidos (7,4). El valor de p se encuentra muy cercano al nivel de significación ($p=0,0562156$), probablemente debido al tamaño de la muestra de Estados Unidos.

Tabla 44. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en muslos procedentes de Brasil y Estados Unidos

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	34	109	$X^2 = 3,65$
EEUU	2	25	$P=0,0562156$

En relación a los pollos enteros, encontramos un 25% de aislamientos en los procedentes de Francia, mientras que en los de Brasil no se obtuvieron muestras positivas, siendo en este caso, como era de esperar, la diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,0006319$).

Tabla 45. Análisis estadístico de los aislamientos de *Salmonella* en pollos enteros procedentes de Brasil y Francia

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	0	39	$X^2 = 11,68$
Francia	19	57	$P=0,0006319$

IV.2. SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS

IV.2.1. TOTAL DE SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS

El serotipo predominante en nuestro estudio es Enteritidis (62,7%), seguido por Heidelberg (10,4%), Typhimurium (7,5%), Virchow (6,0%) y otros serotipos con frecuencias inferiores al 3%.

Para comprobar si el predominio de aislamiento del serotipo Enteritidis es significativo, se realizó el cálculo del estadístico X^2 y del nivel de significación entre éste y todos los otros serotipos identificados, obteniéndose un valor de $p = 0,0301389$ (Tabla 46), como podríamos suponer, dada la distribución porcentual de los serotipos aislados. No se detectaron diferencias significativas entre las frecuencias de los serotipos con menor porcentaje de identificación.

Tabla 46. Análisis estadístico de los serotipos de *Salmonella* aislados

Serotipos	+	-	Análisis Estadístico
Enteritidis	42	364	$X^2 = 4,70$
Otros	25	381	$P = 0,0301389$

Para comparar nuestros resultados con otros en España, disponemos de datos que provienen del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda, al que se envían cepas de *Salmonella* desde diferentes puntos de la geografía española, en los que no se especifica el país de procedencia de la carne de aves estudiada, ni de si se trata de aves frescas o congeladas. Estos resultados son publicados anualmente en el Boletín Epidemiológico Semanal.

En el BES 1997/Vol 5/nº 8 se publica el análisis de los serotipos de *Salmonella* aislados en muestras de carne de aves en 1996, observándose que el serotipo Hadar representó el 25% del total de serotipos aislados, seguido de Enteritidis (24%), Virchow (8,3%) y Typhimurium (6,4%). No se aisló el serotipo Heidelberg.

En el BES 1998/Vol 6/nº 14 se publica el análisis de los serotipos de *Salmonella* aislados en muestras de carne de ave en 1997, encontrando que en este año Enteritidis fue el serotipo más frecuente (45,4%), seguido de Hadar (15,0%), Typhimurium (6,5%), Heidelberg (4,8%) y Virchow (2,1%). Nuestros resultados presentan una gran concordancia con los nacionales, en cuanto al predominio del serotipo Enteritidis.

En un trabajo realizado por nosotros en muslos de pollos frescos de producción local obtuvimos de un total de 39 aislados de *Salmonella* los siguientes serotipos: Typhimurium (37,1%), 4,12:b:-(II) (12,9%), Enteritidis e Infantis ambos con 2,9%. No se aislaron los serotipos Virchow ni Heidelberg.

En 1996 (BES 1997/Vol5/nº3) en cepas de origen humano de casos esporádicos se identificó con mayor frecuencia *S. enteritidis* (43,6%), *S. typhimurium* (29,6%), *S. hadar* (7,2%) y *S. virchow* (3,1%), apreciándose al comparar con los datos de 1997 (BES 1998/Vol 6/nº13), una ligera disminución de la incidencia de *S. enteritidis* (41,9%) y *S. hadar* (6,3%), mientras que el serotipo Typhimurium aumenta a 33,7%, continuando con la tendencia observada en los últimos años de incremento del número de aislamientos de *S. typhimurium* en muestras de origen humano en España. El serotipo Heidelberg se aisló con una frecuencia del 0,3% en 1996 y 6,3% en 1997.

Los datos sobre aislamientos esporádicos de salmonelas en pacientes asistidos en el Hospital Universitario de Canarias (Tenerife) durante los años 1997-1998, muestran que el serotipo Enteritidis representó el 59,5%, seguido de

Typhimurium (29,7%). En este caso se observa una gran similitud del porcentaje de Enteritidis con el obtenido en nuestro estudio (62,7%).

Respecto a la identificación de los serotipos implicados en brotes de salmonelosis en 1996 (BES 1997/Vol5/ nº 3), *S. enteritidis* fue el principal responsable (23,3%), tanto en brotes comunitarios como familiares, seguido por el serotipo Typhimurium (5,5%). En 1997 (BES 1998/Vol6/nº13), *S. enteritidis* fue también el principal responsable (75,0%), tanto en brotes comunitarios como familiares y Typhimurium en segundo lugar con un 10,0%.

En Canarias en 1996, el género *Salmonella*, como en el resto de España, fue el principal agente involucrado en brotes alimentarios con identificación etiológica. De las salmonelas aisladas un 45% correspondió a Enteritidis y el 36,4% a Typhimurium, mientras que en 1997, este último serotipo representó el 66,7% y Enteritidis no fue identificado en ninguno de los brotes investigados, si bien en el 33,3% se aislaron otras *Salmonella* spp. (Dirección General de Salud Pública, Servicio Canario de Salud, 1999).

Evidentemente a pesar de que se observa un incremento progresivo de los aislamientos de *S. typhimurium*, éste debe ser tomado con precaución en cuanto a expresar frecuencias reales, dado a que existen un número de brotes en los que no se identifica el agente causal o que se identifican sólo como *Salmonella* spp.

En los estudios nacionales, las frecuencias de aislamiento en pollos de los serotipos Enteritidis y Typhimurium guardan relación con lo que se observa en clínica humana (casos esporádicos y brotes), a lo que, evidentemente, se añade la capacidad de cada serotipo de producir enfermedad.

Por otra parte, *Salmonella typhimurium* fue el más frecuente en muestras de pollos frescos procedentes de granjas de Tenerife.

IV.2.2. SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS SEGÚN PAÍS DE PROCEDENCIA.

Para comprobar si entre los dos serotipos aislados con más frecuencia, Enteritidis y Heidelberg, existen diferencias significativas según el país de origen (Brasil y Francia), se realizó el cálculo del estadístico X^2 y del nivel de significación. (Tablas 47 y 48).

En el caso del serotipo Enteritidis se comprueba que existen diferencias significativas, aislándose con mayor frecuencia en las muestras de Brasil que en las de Francia.

Tabla 47. Análisis estadístico de *Salmonella enteritidis* según país de origen de la muestra

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	39	7	$X^2 = 27,99$
Francia	3	16	$P = 0,0000001$

En el caso del serotipo Heidelberg se comprueba que no existen diferencias significativas, lo que puede ser debido al escaso número de aislados con este serotipo.

Tabla 48. Análisis estadístico de *Salmonella heidelberg* según país de origen de la muestra

País	+	-	Análisis Estadístico
Brasil	4	42	$X^2 = 0,70$
Francia	3	16	$P = 0,4013959$

Con los otros serotipos identificados no se realiza el análisis estadístico, debido a que en ningún caso se aisló en más de un país el mismo serotipo.

Un exhaustivo análisis llevado a cabo por Kelterborn en 1979, reuniendo millón y medio de cepas de *Salmonella* de origen humano y no humano, aisladas entre 1934 y 1975 en 109 países, fueron identificadas *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. newport* y *S. dublin* como las más predominantes.

Rodríguez y colaboradores (1990) informan el incremento de las infecciones por el serotipo Enteritidis en humanos, en los continentes americanos, europeo e incluso en el africano, según se desprende de los datos del programa de vigilancia de *Salmonella* de la OMS durante el período 1979-1987, sugiriendo que este incremento está relacionado con el consumo de huevos y aves portadoras de este microorganismo.

En una investigación realizada por Plummer y colaboradores (1995) en el Reino Unido en diferentes presentaciones de pollo fresco y congelado para venta al detalle, encontraron en un 51,4% el serotipo Enteritidis y en un 12,2% el Typhimurium.

Wilson et al. (1996) realiza en Irlanda un estudio de prevalencia de salmonelas en pollo refrigerado, encontrando como serotipos más frecuente Bredeney, Enteritidis y Kentucky.

Barnhart y colaboradores (1991) en un estudio realizado en Georgia, Estados Unidos, donde se determinó la presencia de *Salmonella* en ovarios de gallinas en el momento del sacrificio, encontraron a los serotipos: Heidelberg (56,5%), Agona (13,0%), Kentucky (3,5%), Enteritidis (2,4%), Typhimurium (1,7%). Sin embargo, en muestras humanas los serotipos más frecuentes fueron: Typhimurium (22,0%), Enteritidis (15,9%) y Heidelberg (11,3%).

Schoeni et al. (1994) informan que en Estados Unidos, los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Heidelberg aislados de muestras de ovarios y heces de aves, han sido implicados en aproximadamente el 50% de los brotes de salmonelosis en este país.

Nosotros, en las muestras procedentes de Estados Unidos, encontramos el serotipo Kentucky en los 2 aislados.

En Maryland (Estados Unidos), *S. enteritidis* ha sido el agente causal responsable del 37% de todos los aislamientos de *Salmonella* en casos esporádicos y asociados a brotes alimentarios durante 1990 (Morris, 1992).

Poppe (1991) en Canadá, realizó un amplio estudio nacional, sobre contaminación por salmonelas en granjas de crianza de pollos y de ponedoras, encontrando que un 7,2 % de los piensos estaban contaminados por salmonelas. Analizando muestras ambientales de estas granjas (ponederos, bebederos, comederos, etc.), aisló los siguientes serotipos: Heidelberg (20%), Infantis (6,1%), Hadar (5,8%), Enteritidis (2,7%). Sin embargo, en otro estudio realizado por este autor también en Canadá (1994), pero en humanos, la distribución de serotipos encontradas fue diferente: Typhimurium (12,3%), Enteritidis (12,5%), Heidelberg (12,0%) y Hadar (10,9%).

Khakhria (1997), también en Canadá estudia aislamientos de salmonelas de fuentes humana y no humana durante el período 1983-1992, encontrando como serotipos más comunes en ambas fuentes al Typhimurium y el Hadar. En tercer y cuarto lugar se encontró Enteritidis y Heidelberg en humanos y Heidelberg e Infantis en muestras no humanas.

Fantasia et al. (1991) en Italia encuentran en el período 1978-1992 frecuencias de Enteritidis en alimentos y muestras clínicas de 2,6% y 5,4% respectivamente. Este bajo porcentaje, sin embargo se incrementa cuando analiza específicamente huevos y pollos, alcanzando un 53% entre los años 1983-88.

En Brescia (Italia), los serotipos más frecuentemente identificados en muestras de origen ambiental y alimentario fueron Enteritidis (48,1%) y Typhimurium (15,7%) en el año 1992 (Grotolo y Gomarasca, 1994). En este país en el período comprendido entre 1991-1994, el agente causal más frecuente de brotes alimentarios fue la *Salmonella* (81%), en particular el serotipo Enteritidis y salmonelas no-tipadas del grupo D (34% y 33% del total de brotes respectivamente). De 54 brotes estudiados fenotípica y genotípicamente el 92% correspondieron a *S. enteritidis*, 5,5% a *S. typhimurium* y 2% a *S. hadar* (Scuderi et al., 1996).

En Holanda (Van de Giessen et al., 1991) hacen una investigación sobre la presencia de *Salmonella* en pollos, revelando que *S. enteritidis* se encontraba en el 15% de las aves contaminadas por este género.

En Brasil, Tavechio et al. (1996) de un total de 5.490 cepas de salmonelas aisladas durante el período 1991-1995 de infecciones humanas y no humanas, destaca el progresivo incremento del serotipo Enteritidis (1,2% en 1991, 2,05 en 1992, 10,1% en 1993, 44,3% en 1994 y 64,9% en 1995) en el total de los aislamientos. Un significativo aumento en el aislamiento de este serotipo ha sido observado, a partir de 1993, en relación con brotes alimentarios en este país. Por otra parte, también se ha informado de la contaminación por *S. enteritidis* de piensos, representando esto un grave problema para la industria avícola brasileña. En nuestro estudio, el porcentaje del serotipo Enteritidis fue del 84% con respecto a las muestras de Brasil, lo que parece estar en relación con lo descrito por Tavechio y colaboradores (1996).

Sakai y Chalermchaikit, 1996, informan sobre el incremento que en Tailandia ha sufrido el serotipo Enteritidis como responsable de infecciones humanas y de contaminación de la carne de pollo, no ocurriendo lo mismo en otras fuentes.

En Finlandia, Puohiniemi et al., 1997 informan que los últimos brotes en el país han sido causados por *Salmonella bovis* (1994) y *S. Stanley* (1995). Demostró que la fuente del brote por *S. bovis* era la misma que la de

brotos similares presentados en Suecia en el mismo año y la de *S. stanley* a la de brotes ocurridos en Estados Unidos (1995). En ambos casos la demostración se hizo mediante el estudio del análisis del DNA genómico a través de la técnica de campo pulsado y por patrones de resistencia antimicrobiana.

IV.3. FAGOTIPOS DE SALMONELLA IDENTIFICADOS

Como ya se ha mencionado sólo se realizó la tipificación de los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Virchow

IV.3.1. FAGOTIPOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS

En muestras de Francia, el único fagotipo (FT) identificado de Enteritidis ha sido el 4, mientras que en muestras de Brasil se han identificado tres fagotipos: el FT 4 (37), el FT 1 (1) y el FT 7 (1), evidenciándose el predominio del fagotipo 4.

En España, para 1996 tenemos que en muestras humanas los fagotipos más frecuentes para *S. enteritidis* fueron los fagotipos 4, 6 a y 1, con 45,7%, 19% y 12,1% respectivamente (BES 1997/Vol5/nº3). No disponemos de datos de tipificación en ese año para muestras no humanas, ya que no estaba incluida esta técnica en el protocolo del CNMVIS hasta 1997.

En 1997 según datos del BES 1998/Vol6/nº 14, en carne de pollos se identificó en el 73,7% al fagotipo 4, seguido del 6 a (10,6%) y el 1 (5,8%). El fagotipo 4 de *S. enteritidis* también es el más frecuente en humanos (41,7%), el fagotipo 1 aumenta de manera importante, pasando de 12,1% en 1996 a 24,2% en 1997, mientras que el fagotipo 6a ocupa el tercer lugar (15,8%). Nuestros datos, con muestras de pollo congelado importado, coinciden con estos resultados en el predominio del fagotipo 4.

Los datos sobre aislamientos esporádicos de salmonelas en pacientes asistidos en el Hospital Universitario de Canarias (Tenerife) durante los años 1997-1998, muestran que el serotipo Enteritidis representó el 59,5%, siendo los fagotipos más frecuentes 1 (35%), seguido del 4 (30%), 6 (15%) y 8 (10%), sin que éstos coincidan con exactitud con los fagotipos aislados en nuestro estudio, ni con los de datos nacionales, tanto de humanos como de carne de pollo.

Hace falta un estudio amplio en granjas de Tenerife para conocer la distribución de los fagotipos de *S. enteritidis* para poder comparar con los resultados en muestras de origen humano. No obstante, hay que tener en cuenta que los huevos de gallinas juegan un importante papel epidemiológico y no disponemos de datos sobre aislamientos de *Salmonella* en huevos en nuestra comunidad.

Rodríguez y colaboradores (1992) autores pertenecientes al programa de vigilancia de *Salmonella* de la OMS informan del incremento de las infecciones a nivel mundial por el serotipo Enteritidis, siendo en aves FT 8 el más frecuente (58,0%) y en humanos, en casos esporádicos y brotes, la distribución de frecuencia ha sido: FT 8 (42%), FT 13 (37%), FT 14b (8%), FT 9 a (3%) y FT 13 (2%). En este estudio existe concordancia en cuanto a la mayor frecuencia de aparición del FT 8 tanto en humanos como en aves.

Fantasia y Filetici (1994) en Italia encuentran al fagotipo 4 con el 76,8% de frecuencia y el fagotipo 1 en el 10% en muestras de origen humano y alimentario, coincidiendo con Nastasi y Mammina (1996) en el sur de Italia, que identifican en muestras humanas en casos esporádicos y brotes, el FT 4 en el 80%

Cowden et al. (1989) en Reino Unido encuentra el FT 4 en pollos en el 81% y 71% en humanos. Este mismo fagotipo es el más frecuente en todas las muestras de alimentos (huevos, otras carnes, etc.).

En Irlanda, Wilson et al. (1996) en pollos frescos y congelados encuentran en FT 4 como predominante.

En Escocia, Oboegbulem et al. (1993) informa en brotes alimentarios del predominio del FT 8 en el período 1980-85 y del FT 4 a partir de 1986. En el 55% de estos brotes estuvo implicada la carne de aves como vehículo de la infección. Según Sharp (1991) el 50% de las infecciones en humanos causadas por salmonelas corresponden al serotipo Enteritidis, y de éstas el 66,6% al fagotipo 4 y el 8 en un (25,3%).

En Alemania, Katouli et al. (1993) en humanos encuentran los fagotipos 4 (45%) y 8 (20%).

En Dinamarca,, Brown et al. (1994) estudiando el período (1980-90) encuentra en pollos los fagotipos 1 (57,6%) y 4 (28,8%) y el FT 8 sólo lo aíslan en pollos importados, en muestras humanas se invierte el orden de frecuencia de estos fagotipos: FT 4 (61,8%) y FT 1 (17%).

Hickman-Brenner et al., 1991, en Estados Unidos, también encuentran al FT 8 como el más frecuente en aves (32%), representando en todos los animales el 50%. Englobando muestras humanas y animales encuentra la siguiente distribución de FT: 8 (48%), 13 a (20%), 13 (8%), 14 b (8%), siendo los fagotipos 8 y 13 los más relacionados con pollos y huevos causantes de brotes alimentarios.

Poppe et al. en Canadá (1993) señala a los fagotipos 8 y 13 como los más frecuentes en muestras de pollos y en humanos el 8 y el 6 a. El fagotipo 4 no lo aisló en pollos pero sí en humanos. El mismo autor en otro estudio en pollos y su ambiente en las granjas, encuentra la siguiente distribución: FT 8 (55,9%), FT 13 (25%) y FT 13 a (4,4%).

Khakhria et al., 1991, en Canadá encuentran que los fagotipos 8, 13, 4, 13 a y 1 representan el 92% de todos los fagotipos de Enteritidis, aislados de muestras humanas y no humanas. El FT 8 se identificó en el 72% y 70% de muestras no humanas y humanas respectivamente, siendo también el más frecuente en brotes.

Lior y Khakhria (1992), en el mismo país en muestras de humanos, informa que el fagotipo predominante es el 8 (56,8%), seguido del 4 (18,35%), 13 (8,3%) y el 13 a (5,1%), lo que es bastante coincidente con los hallazgos de Poppe.

En el Estado de Sao Paulo (Brasil), Irino y colaboradores estudiando cepas de *S. enteritidis* procedentes de fuentes humana y no humana, durante el período

comprendido entre 1975-1992, identificaron al FT 8 en una frecuencia del 80,9% y el FT 4 con un 65,4% hasta 1993, 99,7% en 1994 y 98,4% en 1995.

A la vista de estos resultados podemos deducir que los fagotipos 4 y 1 predominan en Europa y el fagotipo 8 en América, tanto en muestras de origen clínico como en aislados procedentes de animales.

IV.3.2. FAGOTIPOS DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

No se ha realizado análisis estadístico en este serotipo debido al escaso número de aislamientos (5) hallados en este estudio, todos en muestras procedentes de Francia. Se identificaron tres cepas del FT 204c, una del FT 204 y una de no tipable.

En España, la fagotipia de *S. typhimurium*, comenzó a realizarse en el año 1985 en el Laboratorio de Enterobacterias del CNMVIS, utilizando el juego internacional de bacteriófagos suministrados por el Central Public Health Laboratory, Colindale de Londres. En este año se encontró que los fagotipos 66, 96 y 104 fueron los más frecuentes para muestras de origen humano y el 96 y 104 para muestras de origen no humano (BES nº 1753/1986). En estas fechas no se realizaba aún fagotipado de otros serotipos de *Salmonella*.

Para 1996, tenemos que en muestras de humanas los fagotipos más aislados de *S. typhimurium* en orden de frecuencia fueron el 104 (20%), 193 (13,7%) y el 120 (11%). Este mismo año se dispone de información sobre los fagotipos de *S. typhimurium* más importantes en muestras de alimentos, coincidiendo estos en frecuencia con los de muestras humanos (104, 193 y 120) (BES 1997/Vol5/n8).

En 1997 los tres más importantes siguen siendo el 104, 120 y 193 en humanos (en porcentajes similares al año anterior) (BES 1998/Vol6/nº14), en fuentes no humanas los más predominantes son el 120 (26%) y 104 (17,3%) y específicamente en carne de pollo son el 204 (20%) y 204 c (26,6%), donde se incluyen las cepas enviadas por nosotros.

Hemos encontrado publicados pocos estudios sobre la distribución de fagotipos del serotipo Typhimurium referentes a muestras de carne de pollo.

En un estudio realizado en el Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, de la Universidad de La Laguna en 1996, encontramos en 70 muestras de pollo

fresco de procedencia local un total de 26 *S. typhimurium*, siendo en todos los casos todas del fagotipo 120 (Hernández et al. 1999).

Los datos sobre aislamientos en casos esporádicos y en brotes de *S. typhimurium* en pacientes en Tenerife, durante los años 1996-1998, muestran que el 55,5% de éstos correspondió al FT 104b, el 16,6% al FT 120 y 11,1% al FT 104. El FT 120 se aísla por tanto, en el mismo período, en pollos de granjas de la isla y en humanos, aunque en este caso en porcentaje inferior. Sin embargo, en este estudio de pollos de importación, en el mismo periodo, no hemos encontrado este fagotipo en ningún caso, si bien sólo identificamos 5 aislados de *S. typhimurium*.

Baggesen y Wagener (1994), en Dinamarca, refieren a cinco fagotipos predominantes (10, 12, 66, 110 y 135), representando el 78.8% de los aislamientos. En humanos, el 57,3% de los aislados fueron FT 12. Los fagotipos 110, 120, 135 y 193 constituyeron el 86,5% de los aislamientos en pollos, mientras que estos fagotipos sólo responden del 12,9% de los aislamientos humanos.

En Brasil, Asensi et al. (1995) encuentra la siguiente distribución de fagotipos del serotipo Typhimurium en muestras humanas procedentes de niños con gastroenteritis: 193 (58,7%) y 105 (38,4%), totalmente diferente a los encontrados por nosotros de las muestras de pollo de ese país.

En Escocia, Oboegbulem et al. (1993) en un estudio de cepas de salmonelas aisladas en la época de los ochenta, de brotes de origen humano encontró los fagotipos 110 (21,1%), 49 (13,7%) y el 10 (13,2%).

IV.3.3. FAGOTIPOS DE *SALMONELLA VIRCHOW*

En este estudio hemos identificado 4 aislamientos del serotipo Virchow, dos del FT 8, uno del FT 31 y uno del FT 37. No se realiza análisis estadístico de estos resultados debido al escaso número de aislamientos y a que todos corresponden a muestras procedentes de Francia.

En España para el año 1996, en muestras de origen no humano, el serotipo Virchow ocupa un 4,4 % de frecuencia, de las que el 56% corresponden a muestras de alimento, sin especificar tipo y sin determinación de los fagotipos (BES 1997/Vol5/nº 8). En este año se inicia la fagotipia de este serotipo, en el CNMVIS, pero sólo en muestras de origen humano

En muestras de carne de aves, estudiadas en el año 1997, de 5 determinaciones, tres corresponden al FT 8, una al FT 31 y una al FT 37, perfil que coincide con nuestros resultados.

En muestras de origen humano, se encuentra que los fagotipos de *S. virchow* predominantes son el 8 (44,4%) y el 31 (19,4%) (BES 1997/Vol5/nº3). Similares hallazgos se obtienen en 1997, donde los fagotipos 8 (41,1%), 31 (23,3%) y 19 (15,1%) son los más frecuentes (BES 1998/Vol6/nº13).

En cuanto a los fagotipos de *S. virchow* identificados en muestras de pacientes en Tenerife, encontramos dos: uno FT 8 y uno FT 31, lo que a pesar de escaso número de aislados, coincide con nuestros resultados en pollos congelados y con los encontrados a nivel nacional en carne de aves.

En España, *S. virchow* ha sido la responsable de brotes causados por la ingestión de fórmula láctea infantil contaminada por cepas lactosa (+) (Usera et al., 1998), en la investigación de dichos brotes se encontraron los fagotipos 4 y 2.

Un estudio realizado por Willocks et al. (1996), en Inglaterra y Gales, investiga el incremento en muestras de origen humano del FT 26 de *S. virchow* durante el año 1994. La adquisición de este serotipo lo relacionaban con el consumo de pollo. Sugiriendo los autores que este incremento de *S. virchow* podría ser un indicador de la importancia que en el futuro tendrá este serotipo en las aves.

IV.4. TIPADO GENÓMICO

A la vista de los resultados, el enzima *XbaI* utilizado, a pesar de ser el que más se refiere en la bibliografía (Suzuki et al., 1995; Thong et al., 1995; Murase et al., 1995; Liebisch y Schawarz, 1996; Matushek et al. 1996; Thong et al., 1998; Lee et al., 1998), no se muestra discriminativo en este caso, dado que probando diferentes fagotipos y de orígenes distintos se encontró que todos los aislados (19) ensayados, excepto uno tenían el mismo patrón de banda, razón por la que no se prosiguió con este ensayo.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por otros autores que afirman la necesidad de la utilización dos o tres enzimas, como por ejemplo *NotI* (Bautsch, 1993), *SpeI* (Lee et al., 1998), *BlnI* (Murase et al., 1995), *AvrII* (Thong et al., 1998) para la macrorrestricción en campo pulsado de aislados de *Salmonella*, sin que hasta ahora se haya llegado a encontrar el enzima que solo o combinado con otro permita obtener pulsotipos que nos sirvan como marcadores epidemiológicos.

IV.5. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE SALMONELLA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Los antibióticos son utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas de humanos y animales y también son administrados de manera profiláctica para prevenir las infecciones y en dosis subterapéuticas en los piensos de los animales. El uso de los antibióticos como aditivos en los piensos fue aprobado en 1950, después de que se conociera que su uso incrementaba el grado de crecimiento, mejoraba la conversión del alimento y reducía la mortalidad y morbilidad por infecciones clínicas y subclínicas en los animales (Gersema y Helling, 1986).

Sin embargo, el uso de un antimicrobiano en humanos o en animales, es a menudo seguido de la aparición de microorganismos resistentes, lo que conlleva a fallos terapéuticos y a la necesidad de buscar nuevas sustancias antimicrobianas, generalmente más costosas.

Varios investigadores afirman que el fenómeno de la resistencia está relacionado con la cantidad y las pautas en el uso de los mismos y recomiendan el uso prudente, tanto en humanos como en animales.

En 1994, el grupo de trabajo científico de la OMS para la monitorización y manejo de resistencias bacterianas a agentes antimicrobianos desaprueban el uso innecesario de antibióticos con fines profilácticos en animales para consumo humano y recomiendan que los agentes antimicrobianos no sean usados como sustituto de la adecuada higiene animal (WHO, 1994).

La mayoría de las infecciones por *Salmonella* no requieren tratamiento, no estando indicado en el caso de gastroenteritis no complicadas, ya que no reducen la duración o severidad de los síntomas e incluso puede prolongar la convalecencia y el

estado de portador y pueden llevar a la emergencia de microorganismos resistentes (Aserkoff y Bennett, 1969).

Los pacientes con bacteriemia, meningitis u otra infección extraintestinal, requieren tratamiento antimicrobiano efectivo. El Cloramfenicol fue la droga de elección durante décadas, siendo otras drogas efectivas Ampicilina, el Cotrimoxazol y más recientemente la Ciprofloxacina. Estos cuatro antimicrobianos son los que aconseja el NCCLS ensayar en cepas de origen clínico de *Salmonella spp.* y en ellos basaremos la discusión de nuestros resultados en este capítulo y posteriormente las conclusiones.

Si aumenta la frecuencia de resistencia a estos antimicrobianos, la elección de agentes que puedan usarse para el tratamiento de los pacientes se limita y se incrementa la probabilidad de que la terapia inicial, escogida antes de disponer de los resultados de susceptibilidad *in vitro*, fracase.

Otro impacto de la resistencia antimicrobiana es la conocida asociación entre las salmonelas resistentes y el uso rutinario en clínica de antimicrobianos para infecciones diferentes a la salmonelosis. Esta asociación puede tener tres facetas:

1. Las infecciones por salmonelas resistentes pueden complicar el tratamiento antimicrobiano a otras infecciones.
2. El tratamiento antimicrobiano previo permite que un pequeño número de salmonelas resistentes provoquen infecciones sintomáticas, debido, incluso, a la disminución de la dosis infecciosa necesaria para provocar enfermedad.
3. Un incremento en la proporción de salmonelas resistentes aumenta globalmente las salmonelosis.

Durante la terapia antimicrobiana en humanos, las salmonelas pueden adquirir factores de resistencia transferidos de otros microorganismos entéricos.

El uso de dosis subterapéuticas de antimicrobianos como promotores de crecimiento produce efectos en los animales similares a los vistos en humanos que reciben tratamiento antimicrobiano para salmonelosis, es decir, desarrollan resistencia (Williams et al., 1978).

Los antibióticos en Veterinaria se utilizan en forma más prolongada y constante en dosis subterapéuticas, produciendo un mayor impacto sobre la aparición y persistencia de resistencias. Por otra parte, el uso de antimicrobianos en animales, al igual que en humanos, constituye un factor de riesgo para inducir enfermedad.

Por estas razones, el uso de los antibióticos en animales requiere autorización por parte de la Unión Europea. Desde hace casi tres décadas, se han venido elaborando una serie de normativas para regular el uso de aditivos en alimentación animal, entendiendo por aditivos las sustancias que producen un efecto positivo sobre los alimentos a los que se incorporan, así como sobre las producciones animales, incluyendo los antibióticos, que empleados en pequeñas dosis, producen efectos fisiológicos de nutrición, mientras que en dosis elevadas su acción es la de sustancias medicamentosas.

La Directiva (70/524/CEE) de 23 de Noviembre de 1970 sobre los aditivos en alimentación animal contempla en su Anexo I, parte A, el uso en aves de los antibióticos Bacitracina-Zinc, Tetraciclinas, Oleandomicina, Penicilina-G-Potásica, Espiromicina, Virginiamicina y Flavofosfolipol (todos para uso en aves excepto patos, ocas y gallinas ponedoras).

El Real Decreto 851/1975, de 20 de Marzo, por el que se establece la reglamentación de las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales, en su anexo de aditivos, permite además el uso de Bacitracina-Zinc y Flavofosfolipol en gallinas ponedoras, a diferencia de la Directiva 70/524/CEE y permite el uso de la Avoparcina en pollos y pavos de carne.

La Directiva 85/429/CEE de la Comisión, modifica los anexos de la Directiva 70/524/CEE del Consejo, quedando permitidos para su uso en aves los siguientes antibióticos: Espiramicina, Virginiamicina, Flavofosfolipol (excepto en patos, ocas y gallinas ponedoras), Bacitracina-Zinc (excepto patos y ocas) y Avoparcina (en pavos y pollos de engorde).

El Real Decreto 418/1987, sobre las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales, transpone la legislación de la CEE sobre aditivos en alimentación animal contenida en la Directiva 70/524/CEE del Consejo y las que la modifican hasta la Directiva de la Comisión 87/552/CEE, de 17 de Noviembre de 1987. Este Real decreto suprime el uso de la Avoparcina.

De la manera similar, modificaciones sucesivas de la Directiva 70/524/CEE, han ido paulatinamente prohibiendo, en Veterinaria, el uso de antibióticos que se encuentren dentro de los grupos utilizados en humanos.

Así, por ejemplo la Directiva (97/6/CEE) de 30 de Enero, establece con carácter cautelar, que no se conceda ninguna autorización de aditivos del grupo de los polipéptidos, suprimiendo el uso de la Avoparcina en todos los países miembros de la Unión Europea, a raíz de que Dinamarca (1995) y Alemania (1996) prohibieron el empleo de la Avoparcina en la alimentación animal, ya que en su opinión representa un peligro para la salud humana, debido a que este antibiótico, puede transferir resistencia a otros del mismo grupo reservados para el tratamiento de infecciones graves en humanos.

A partir de Junio del presente año, según el Reglamento 2821/98 del Consejo de la Unión Europea, no se podrán adicionar los siguientes antibióticos en la alimentación animal: Bacitracina-Zinc (polipéptido), Espiramicina (macrólido), Virginiamicina (estreptogramina) y Fosfato de Tilosina (macrólido).

IV.5.1. SUSCEPTIBILIDAD DEL TOTAL DE AISLADOS DE *SALMONELLA* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Los aislados de *Salmonella* mostraron las mayores resistencias *in vitro* para los antibióticos Piperacilina (52,2%), Aztreonam (52,2%), Cloramfenicol (34,3%), Tetraciclina (22,4%) y Ampicilina (19,4%).

Las resistencias observadas frente al Cloramfenicol, Tetraciclina y betalactámicos, podrían explicarse por el uso indiscriminado que han tenido en clínica veterinaria y como promotores de crecimiento en las aves.

La discusión de estos resultados la enfocaremos, dado el número de antibióticos testados, en los que de acuerdo a los criterios de la NCCLS, deben ser ensayados en pruebas de susceptibilidad *in vitro* en el caso de salmonelas de origen humano (Ampicilina, Cloramfenicol, Cotrimoxazol y Ciprofloxacina).

Los porcentajes de resistencia a estos antibióticos para el total de cepas aisladas en nuestro estudio fueron para el Cloramfenicol un 34,3, para Ampicilina de 19,4, al Cotrimoxazol de 11,9 y a la Ciprofloxacina un 3.

Existen escasos estudios sobre resistencia de antimicrobianos en cepas aisladas de pollos y un número importante de ellos referidos a cepas de origen clínico.

En un estudio ya mencionado en muslos de pollo fresco de procedencia local los porcentajes de resistencia encontrados fueron de 80 frente al Cloramfenicol y del 63,3, para la Ampicilina, sin que se observen resistencias frente al Cotrimoxazol y Ciprofloxacina. Como se puede apreciar, los porcentajes de resistencia a los dos primeros antibióticos mencionados es muy elevada, si bien hay que mencionar, que la mayoría de estos aislados corresponden al serotipo Typhimurium, ampliamente conocido por su resistencia a diversos antimicrobianos (Hernández et al., 1999).

En pacientes asistidos en el Hospital Universitario de Canarias durante los años 1997-98 con cultivos positivos para esta bacteria, encontramos un porcentaje de resistencia al Cloramfenicol de 36,1, a la Ampicilina de 30,6 y al Cotrimoxazol de 11,4. En el caso de Ciprofloxacina no aparecen resistencias. Cabe destacar que el porcentaje de resistencia de Cloramfenicol y Cotrimoxazol es prácticamente igual al de nuestro estudio, sin embargo frente a la Ampicilina es superior. En ambos casos la Ciprofloxacina se comportó como el antibiótico más efectivo *in vitro*.

En España, en un estudio de Luque et al. (1994) en aislados de *Salmonella* de diferentes orígenes, encontraron que las cepas procedentes de alimentos no presentaron resistencia a Ampicilina y Cotrimoxazol. Al Cloramfenicol el porcentaje de resistencia fue de 21,7. En este mismo trabajo, y en cepas de origen clínico, no se detecta resistencia al Cotrimoxazol y sí a la Ampicilina (14,6%) y Cloramfenicol (11,9%). No ensayaron Ciprofloxacina.

En un trabajo ya citado, realizado en Canadá por Poppe et al. (1996) sobre la frecuencia de resistencia de los aislamientos de *Salmonella*, no se encontraron cepas resistentes a Ciprofloxacina ni en el caso de ponedoras ni en los pollos de engorde. Menos del 1% lo fue frente a Cotrimoxazol, entre 1-2% a Cloramfenicol y entre el 2-3% a la Ampicilina.

En este mismo país otros autores (D'Aoust et al., 1992) señalan que para el período 1986-1989 la carne de aves constituye el principal reservorio de fenotipos multirresistentes de *Salmonella*, siendo los porcentajes de resistencia observados muy bajos, 3,4 para Ampicilina y 0,4% para Cloramfenicol. En este estudio ninguna cepa fue resistente a Cotrimoxazol y no se ensayó la Ciprofloxacina.

Las bajas resistencias a Ampicilina y Cotrimoxazol de estos autores canadienses mencionados, concuerdan con el estudio de McGarr et al. (1997) también realizado en pollos en Canadá.

Tessi y colaboradores (1997) realizan En Buenos Aires (Argentina) un estudio de resistencias de aislados de *Enterobacteriaceae* en canales de pollo encontrando un 21,5%, 9,7% y 8,6% de resistencia de *Salmonella* frente a Ampicilina, Cotrimoxazol y Cloramfenicol respectivamente. Estos autores tampoco ensayan susceptibilidad *in vitro* de los aislados frente a la Ciprofloxacina.

En el Reino Unido, Wray et al. en 1993 dentro del programa de vigilancia de las resistencias antimicrobianas de *Salmonella* en este país, encuentran que el 24% de los aislamientos de *Salmonella* en animales son resistentes a los antibióticos estudiados (16 antibióticos).

Ramos et al. (1996) en un estudio realizado en Madrid en un hospital del área urbana de Madrid (1980-1994) sobre salmonelosis encuentran que la resistencia a uno o más antibióticos (particularmente a Ampicilina y Cloramfenicol) de las salmonelas, aumentó significativamente durante el período de estudio. En un total de 1468 aislados encuentra un porcentaje global de resistencia del 17,6%, correspondiendo 12, 4,1 y 2,1% a Ampicilina, Cloramfenicol y Cotrimoxazol respectivamente.

En otro hospital de Madrid, Muñoz et al. (1993) estudiaron la resistencia antimicrobiana de 961 aislados clínicos de *Salmonella* recolectadas entre 1988-1991, observando que las resistencias totales frente a Ampicilina, Cloramfenicol y Cotrimoxazol fueron de 32, 11 y 2% respectivamente. Presentando la resistencia al Cloramfenicol un incremento significativo del 9 al 16% durante el período estudiado, mientras que las resistencias a las otras drogas se mantuvieron estables. Ninguna de las cepas fue resistente a Ciprofloxacina.

En otras zonas de España el porcentaje de resistencia de *Salmonella* a Cotrimoxazol es muy bajo y similar al encontrado en otras instituciones hospitalarias españolas, representando ésta una alternativa importante para el tratamiento vía oral ante cepas resistentes a Ampicilina, la que ha alcanzado hasta un 45,8% de

resistencia como lo señalan en sus estudios Alos et al. y Pérez de León et al. (ambos publicados en 1990).

En otros países, la resistencia de *Salmonella* de origen humano frente Ampicilina es muy variable, oscilando por ejemplo entre un 1,5% en Nueva Zelandia (Hefferman, 1991), 17% en Líbano (Araj et al., 1994) y un 85,4% en Irán (Farhoudi-Moghaddam et al., 1990).

En el Norte de África, América del Sur y Asia la resistencia de los aislados de *Salmonella* en pacientes al Cloramfenicol constituye también un problema, alcanzando alrededor de un 10% (Cherubin, 1990; Williams et al., 1989). En países como Líbano se han informado de un 19% de cepas resistentes a este antibiótico y un 15% de resistencia frente al Cotrimoxazol (Araj et al., 1994).

En 1983, según datos del Center for Disease Control de Atlanta (MMWR, 1984) sobre cepas de *Salmonella* en humanos, los porcentajes de resistencia fueron de 38, 9 y 3 para Ampicilina, Cloramfenicol y Cotrimoxazol respectivamente, siendo estos hallazgos similares a los descritos por Muñoz et al. (1993) en un hospital español.

Por su parte, Lee y colaboradores (1994), también en Estados Unidos, estudiando las infecciones de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos entre 1989-1990, determinan un incremento de cepas resistentes (de 17% a 31%) y en la resistencia a Ampicilina (10% a 14%) al compararlo con datos de un estudio similar realizado entre 1979-1980.

En cuanto a las resistencias de *Salmonella* en muestras de origen humano aisladas durante el período 1975-1986, en Japón, Machida y Shigiyama (1988), ensayando 24 agentes antimicrobianos, encontraron que en un total de 148 aislamientos, las resistencias más alta se presentaban frente a las penicilinas sintéticas, obteniéndose a la Ampicilina un 21%. Por otra parte, el 11% de los

aislados fueron resistentes a Cloramfenicol y no hubo resistencia frente a Cotrimoxazol. En este estudio no es testada la Ciprofloxacina.

IV.5.2. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS SEROTIPOS DE *SALMONELLA* AISLADOS CON MAYOR FRECUENCIA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Se discute la susceptibilidad antimicrobiana de los serotipos aislados con mayor frecuencia en nuestro estudio, es decir: Enteritidis, Heidelberg, Typhimurium y Virchow frente a Ampicilina, Cloramfenicol, Cotrimoxazol y Ciprofloxacina.

A la hora de comparar con otros estudios, tanto en muestras de pollos, como en aislados humanos, hemos encontrado escasa bibliografía sobre resistencia de serotipos específicos frente a los antimicrobianos.

IV.5.2.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Los aislados de *Salmonella enteritidis* mostraron mayor resistencia *in vitro* frente a los antibióticos Piperacilina, Aztreonam y Cloramfenicol.

Los porcentajes de resistencia de las 42 cepas aisladas de *Salmonella enteritidis* fueron en nuestro estudio de 35,5% para el Cloramfenicol y de 7,1% para Ampicilina, sin que se obtuviese resistencia ante Cotrimoxazol y Ciprofloxacina.

En un estudio, ya mencionado, en muslos de pollo fresco de procedencia local, en el que sólo aislamos 2 cepas de *Salmonella enteritidis*, encontramos que ambas fueron resistentes al Cloramfenicol y Ampicilina, sin que apareciese resistencia frente al Cotrimoxazol y Ciprofloxacina (Hernández et al., 1999).

De pacientes asistidos en el Hospital Universitario de Canarias, de un total de 20 aislados de *Salmonella enteritidis*, encontramos las mayores resistencias a Ampicilina (33,3) y Cloramfenicol (30,0), mientras para Cotrimoxazol la resistencia fue del 5% y en el caso de Ciprofloxacina todos los aislados fueron sensibles.

En España, en un estudio de Luque et al. (1994) en aislados de *Salmonella* de diferentes orígenes, encontraron que *S. enteritidis* no presentaba resistencia al Cotrimoxazol. Frente a la Ampicilina el porcentaje de resistencia era de 8,5 y al Cloramfenicol 7,2. No se ensayó la Ciprofloxacina.

Un estudio español ya citado, Muñoz et al. (1993) encuentran que en 159 cepas de *Salmonella enteritidis* de origen humano, se presenta una tendencia a la disminución, durante el período 1988-1991, de los porcentajes de resistencia frente a la Ampicilina de este serotipo, de 29% en 1988 hasta 16% en 1991. En cuanto a las resistencias frente a Cloramfenicol, estos autores observan la misma tendencia entre 1988 y 1990, disminuyendo los porcentajes de 6 a 0,5 respectivamente, con un ligero ascenso en 1991 (1%). Frente al Cotrimoxazol, se presentan bajos porcentajes de

resistencia con tendencia a incrementarse en el período de estudio, oscilando entre 0,01% en 1988 y 2% en 1991. No se ensayó la Ciprofloxacina.

En el Reino Unido, Wray et al. en 1993, encuentran que en el período 1988-90 los porcentajes de *Salmonella enteritidis*, procedentes de animales, que eran resistentes a Ampicilina oscilaban entre el 1-5 y entre 0-4 para Cotrimoxazol, sin que se presentasen resistencias al Cloramfenicol en los tres años estudiados. Estos porcentajes son sensiblemente menores a los descritos anteriormente.

Nair et al. (1995) en Estados Unidos, compara la resistencia antimicrobiana de cepas de este serotipo, de dos orígenes, humanas y de pollos. Concluyen que la resistencia a la Ampicilina es más frecuente en los pollos que en humanos, no encontrando diferencias en la expresión de la resistencia a Cloramfenicol, Cotrimoxazol y Ciprofloxacina entre las dos fuentes. Todos los aislados de *Salmonella enteritidis* de humano y la mayoría de los pollos fueron sensibles a Cotrimoxazol.

IV.5.2.2. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *SALMONELLA HEIDELBERG* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Los aislados de *Salmonella heidelberg* mostraron mayor resistencia *in vitro* frente a los antibióticos Cefazolina, Tetraciclina y Tobramicina.

El porcentaje de resistencia de las 7 cepas aisladas de *Salmonella heidelberg* es en nuestro estudio de 28,6% para el Cloramfenicol, sin que se obtuviesen resistencias ante Ampicilina, Cotrimoxazol y Ciprofloxacina.

Este serotipo no se ha aislado en el estudio de muslos frescos realizados en el Área de Medicina Preventiva y Salud Pública ni en humanos asistidos en el Hospital Universitario de Canarias.

A nivel general, existen muy pocos estudios sobre susceptibilidad a los antibióticos, específicamente de este serotipo, debido probablemente a la baja frecuencia de su aislamiento en humanos.

En los Estados Unidos, MacDonald et al. (1987), estudiando la susceptibilidad antimicrobiana de este serotipo en muestras de origen humano, encontraron una disminución significativa del porcentaje de cepas resistentes de 67 en 1979-80 a 35 en 1984-85, sugiriendo que esto puede deberse a la restricción en el uso de antibióticos específicos como promotores de crecimiento en aves. El 69% de los aislados de este serotipo en muestras de origen no humano correspondían a pollos.

IV.5.2.3. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Los aislados de *Salmonella typhimurium* mostraron mayor resistencia *in vitro* frente a los antibióticos Ampicilina, Piperacilina y Cefazolina.

Los porcentajes de resistencia de las 5 cepas aisladas de *Salmonella typhimurium* fueron en nuestro estudio de 100 para Ampicilina, 60 y de 20 tanto para el Cotrimoxazol como para la Ciprofloxacina.

En el estudio ya mencionado, en muslos de pollo fresco de procedencia local, en el que aislamos 19 cepas de esta *Salmonella*, encontramos que los porcentajes de resistencia eran de 89 para Cloramfenicol y Ampicilina, sin que apareciesen resistencias frente al Cotrimoxazol y Ciprofloxacina (Hernández et al., 1999).

De pacientes asistidos en el Hospital Universitario de Canarias, de un total de 12 aislados de *Salmonella typhimurium*, encontramos las mayores resistencias a Cloramfenicol (58,3%) y Ampicilina (50%), mientras para Cotrimoxazol la resistencia fue del 25% y en el caso de Ciprofloxacina todos los aislados fueron sensibles.

De estos tres trabajos se puede deducir, que en nuestro medio, las salmonelas de este serotipo tanto de origen humano, como de pollos frescos y de importación, tienen porcentajes de resistencia muy elevados a los antibióticos, siendo de evidente interés los resultados frente al Cloramfenicol y Ampicilina.

En España, en un estudio de Luque et al. (1994) en aislados de *Salmonella* de diferentes orígenes, encontraron que de 34 cepas de *S. typhimurium* el 23,5% presentaban resistencia al Cloramfenicol, 17,6% a la Ampicilina y 8,8% a Cotrimoxazol. No se ensayó la Ciprofloxacina. Los porcentajes de resistencia si bien importantes, son claramente inferiores a los obtenidos por nosotros.

Brisabois et al. (1997) en Francia informan sobre el rápido incremento de la incidencia en resistencia antimicrobiana y la emergencia de cepas multirresistentes aisladas en animales y humanas, encontrando que el 76% de las cepas humanas eran multirresistentes y en el 73% en las cepas de origen animal, incluyendo esta multirresistencia entre otros a Ampicilina y Cloramfenicol.

Wray et al. (1991) en 8677 cepas de *S. typhimurium* aisladas de animales en Inglaterra y Gales durante el período 1984-87, obtuvo porcentajes de resistencia para Ampicilina, Cotrimoxazol y Cloramfenicol entre 36,5 y 58,8.

Los mismos autores, en 1993, encuentran que en el año 1990 de salmonelas aisladas de animales, los porcentajes de resistencia para Ampicilina, Cotrimoxazol y Cloramfenicol eran de 30, 28 y 23 respectivamente.

En el Reino Unido, Threlfall et al. (1993) afirman que la incidencia de cepas multirresistentes de *S. typhimurium* aisladas de humanos se ha duplicado durante un período de ocho años (1981-88). En animales, también observan este incremento, siendo mayor en el caso de bóvidos y cerdos, que en pollos. En el ganado vacuno, el uso continuo de diversos antimicrobianos ha sido un factor contribuyente importante en la emergencia de cepas multirresistentes de *S. typhimurium*, sin embargo, en pollos esta multirresistencia es menos acusada, según los mismos autores, debido al uso menos intensivo de antimicrobianos. En el caso de *S. enteritidis* asociada a pollo no encuentran multirresistencia.

En Madrid, Muñoz et al. (1993) estudiando aislados de *S. typhimurium* en muestras de origen humano, encuentran una tendencia contraria a la observada por los mismos autores para *S. enteritidis* con respecto a la resistencia frente Ampicilina y Cloramfenicol. En ambos casos, los porcentajes de cepas resistentes aisladas aumentan progresivamente en el período 1988-1991, oscilando la resistencia ante la Ampicilina entre 30 y 65% para 1988 y 1991 respectivamente y frente al Cloramfenicol de 10 a 56%. En cuanto al Cotrimoxazol, encuentran una resistencia media del 4% (2-6%).

También en España, en otro hospital de Madrid, Ramos et al. (1996) determinaron los cambios en los patrones de resistencia de *Salmonella typhimurium*, encontrando que en el período 1980-1994, las resistencias a Ampicilina y Cloramfenicol se incrementaron desde 15,2% y 7,6% a 73,3% y 46,7%, respectivamente.

En Italia, Falbo et al. (1982) informan de la existencia de un 38% de cepas de *S. typhimurium* multirresistentes aisladas de pacientes, incluyendo al Cotrimoxazol.

En Alemania, Gross et al. (1998) afirman que el porcentaje de cepas multirresistentes de este serotipo en humanos se incrementó significativamente entre 1987 y 1996 desde un 27% a 52,4%.

En Brasil, Campos y Hofer (1989) describen cepas multirresistentes de este serotipo en diversas fuentes (humanas, ambientales, animales, alimentos, piensos), principalmente a Ampicilina y Cotrimoxazol.

La multirresistencia de *Salmonella typhimurium* ha sido ampliamente estudiada por diversos autores. Éstos han informado de la reciente emergencia de cepas multirresistentes del fagotipo 104, en diferentes países.

Threlfall et al. 1997 señalan que el fagotipo 104, resistente a Ampicilina y Cloramfenicol, entre otros, se ha hecho frecuente en humanos en Inglaterra y Gales, a partir de 1990. En este mismo estudio afirman que mientras que el ganado vacuno es el principal reservorio de estas cepas, pero desde 1993 también se ha hecho predominante en otros alimentos de origen animal incluyendo pollos, ovejas y cerdos. Así en humanos, en el año 1990 las resistencias a Ampicilina, Cloramfenicol, Cotrimoxazol y Ciprofloxacina fueron de 37%, 32%, 0,4% y 0% respectivamente, incrementándose progresivamente hasta alcanzar en 1996 los valores de 95%, 94%, 24% y 14%. Los autores sugieren que en los casos de Cotrimoxazol y Ciprofloxacina estos incrementos están relacionados con el uso en medicina veterinaria de Trimetoprim en ganado vacuno (específicamente para infecciones causadas por el FT

104 multirresistente) y de Enrofloxacin (Fluorquinolona) en el ganado vacuno y pollos para el tratamiento y profilaxis de infecciones. Este último antimicrobiano se permitió su utilización en Veterinaria a partir de 1993 en el Reino Unido.

Estos autores afirman, que sin lugar a duda, la persistencia en alimentos de origen animal del Fagotipo 104 en Gran Bretaña y en diversos países europeos ha sido fortalecida por el uso de antibióticos en la crianza animal, no sólo en el tratamiento de animales enfermos sino como profilácticos.

Glynn et al. (1998) concluye que en Estados Unidos el fagotipo 104 multirresistente de *S. typhimurium* se ha convertido en un patógeno de importancia en este país, aconsejando el uso prudente de antimicrobianos en las granjas de animales y expresa la necesidad de realizar una mejor prevención de enfermedades en las granjas para reducir la diseminación de cepas multirresistentes.

De todos los estudios citados, podemos deducir que *S. typhimurium* es el serotipo que presenta mayores resistencia frente a los antimicrobianos que comúnmente se utilizan en el tratamiento de infecciones humanas y que deben ser testados según normas de la NCCLS. Estas resistencias, principalmente a la Ampicilina y al Cloramfenicol, se vienen observando tanto en cepas humanas como en animales, e incluso según diversos estudios, ya señalados, se ha incrementado en los últimos años.

En nuestro trabajo, también en concordancia con lo descrito, este serotipo es el que presentó las mayores resistencias frente a los antibióticos ensayados.

IV.5.2.4. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *SALMONELLA VIRCHOW* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS

Los aislados de *Salmonella virchow* mostraron mayor resistencia *in vitro* frente a los antibióticos Ampicilina, Cefazolina y Cotrimoxazol.

El porcentaje de resistencia de las 4 cepas aisladas de *Salmonella virchow* es en nuestro estudio del 50% para el Cotrimoxazol y Ampicilina y no se observaron resistencias ante Cloramfenicol y Ciprofloxacina.

Este serotipo no se ha aislado en el estudio de muslos frescos realizado en el Área de Medicina Preventiva y Salud Pública.

A nivel general, existen muy pocos estudios sobre susceptibilidad a los antibióticos, específicamente de este serotipo, debido probablemente a la baja frecuencia de su aislamiento en humanos y en animales.

Luque et al. (1994) en su estudio de cepas de *Salmonella* de diferentes orígenes, en 5 aislados de este serotipo no encontraron resistencia frente a Ampicilina, Cloramfenicol y Cotrimoxazol. No se ensayó con Ciprofloxacina.

Muñoz et al. (1993), al estudiar las susceptibilidad antimicrobiana de cepas del serogrupo C7 de *Salmonella* aisladas en muestras clínicas, de las que el 89% correspondían a *S.virchow* encontraron una tendencia al incremento de la resistencia de este serotipo a la Ampicilina, oscilando entre 43% y 59% para 1988 y 1991 respectivamente. Ocurre lo contrario ante el Cotrimoxazol, en el que las resistencias han disminuido de 14 a 8% entre 1988-1990. En 1991, no se aisló este serotipo. En el caso del Cloramfenicol, observaron una disminución desde un 71% en 1988 hasta un 8% en 1990, con marcado incremento en 1991 (24%).

Threlfall et al. (1993) en un estudio de resistencias de cepas de *Salmonella* de origen humano y animales de consumo humano en Inglaterra y Gales, encontraron

para el período comprendido entre 1981-1988 un incremento de la frecuencia de cepas resistentes de *Salmonella virchow*, siendo particularmente frecuente la aparición de multirresistencia asociada a carne de pollo importada de Francia.

V. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de aislamiento de *Salmonella* en muestras de pollos congelados de importación obtenida en nuestro estudio es alta, similar a la de otros estudios, nacionales y de otros países, si bien esta frecuencia de aislamiento ha descendido mucho a nivel mundial, como se desprende de los resultados de estudios de la década pasada o principios de ésta.
2. Según el país de origen, en nuestro estudio la frecuencia más alta de aislamiento de *Salmonella* la presenta Francia, seguido de Brasil, siendo las diferencias significativas entre estos países. Estados Unidos ocupa el último lugar, si bien el reducido número de muestras no permite obtener resultados estadísticamente significativos.
3. Según el tipo de muestras, la mayor frecuencia de aislamiento corresponde a los muslos, seguido de los pollos enteros y por último las pechugas. No es posible establecer comparaciones con otros estudios ya que sólo hemos encontrado un estudio en la literatura que establezca esta diferenciación.
4. La frecuencia de aislamiento en piel es superior a la obtenida a partir de las muestras de músculo, siendo en el caso de pollos enteros la diferencia significativa.
5. El serotipo de *Salmonella* aislado con mayor frecuencia es con gran diferencia el Enteritidis, seguido a gran distancia y en este orden por Heidelberg, Typhimurium y Virchow. Los restantes serotipos aislados, siete en total, lo son en una frecuencia mínima. Nuestros resultados son concordantes con las publicaciones a nivel nacional.
6. Según país de origen, en Brasil llama la atención la ausencia de los serotipos Typhimurium y Virchow, manteniendo Enteritidis la primera posición con gran diferencia sobre Heidelberg que es el siguiente. Francia presenta mucha más diversidad de serotipos aislados, sin que en este caso Enteritidis sea el predominante. En Estados Unidos el único serotipo aislado es el Kentucky, si bien el número de muestras es bajo. En estudios realizados en otros países se

- observan frecuencias muy diferentes, variando los serotipos predominantes, si bien en general, Enteritidis, Typhimurium y Heidelberg ocupan los primeros lugares.
7. El fagotipo de *Salmonella enteritidis* predominante, tanto en Francia como en Brasil ha sido el 4, lo que guarda correspondencia con el encontrado en España y otros países europeos, mientras que en América del Norte predomina el fagotipo 8.
 8. Para el serotipo Typhimurium se ha identificado los fagotipos 204c y 204, con predominio del primero, si bien el número de aislamiento de este serotipo es muy limitado.
 9. Para el serotipo Virchow se han identificado los fagotipos 8, 31 y 37, si bien el número de aislamiento de este serotipo es muy limitado.
 10. El pulsotipo, como marcador epidemiológico, realizando el análisis de macrorrestricción en campo pulsado con el enzima Xba I, carece de poder discriminativo para los aislados de nuestro estudio.
 11. El total de aislados de *Salmonella* mostraron las mayores resistencias *in vitro* y por este orden, al Cloramfenicol, Ampicilina y Cotrimoxazol. La Ciprofloxacina se comporta como el antibiótico más efectivo *in vitro* frente a nuestros aislados. Nuestros resultados evidencian una resistencia más elevada que en otros estudios, sobre todo al Cloramfenicol y a la Ampicilina
 12. Los aislados de *Salmonella enteritidis* mostraron las mayores resistencias *in vitro*, por este orden, al Cloramfenicol y a la Ampicilina. No se obtuvieron resistencias al Cotrimoxazol y la Ciprofloxacina.
 13. Los aislados de *Salmonella heidelberg* mostraron resistencia al Cloramfenicol. No se obtuvieron resistencias a la Ampicilina, al Cotrimoxazol y la Ciprofloxacina. Este serotipo se comportó como el más sensible de nuestro estudio.

14. Todos los aislados de *Salmonella typhimurium* fueron resistentes a la Ampicilina, presentando también frente al Cloramfenicol porcentajes de resistencia elevados. En este serotipo se encontraron resistencias moderadas frente al Cotrimoxazol y la Ciprofloxacina. Estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores que señalan a este serotipo como el más resistente, principalmente a la Ampicilina.

15. Todos los aislados de *Salmonella virchow* mostraron las mayores resistencias *in vitro* a los antibióticos Cotrimoxazo y Ampicilina. No se obtuvieron resistencias al Cloramfenicol y la Ciprofloxacina.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Aber RC y Mackel DC. Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. *Am J Med* 1981;70:899-905.

Agüero J, Faundez G, Nunez M et al. Choleraform syndrome and production of labile enterotoxin (CL/LT1)-like antigen by species of *Salmonella infantis* and *Salmonella haardt* isolated from the same patient. *Rev Infect Dis* 1991;13:420-3.

Agunod M, Yamaguchi N, López R et al. Correlative study of hydrochloric acid, pepsin, and intrinsic factor secretion in new borns and infants. *Am J Dig Dis* 1969;45:14-26.

Alos JI, González-Palacios R, Sánchez-Moreno MP y Calderon P. Alta frecuencia de elevada resistencia a ampicilina de *Salmonella* spp. no typhi. *Med Clin (Barcelona)* 1990;95:175-7.

Ames BN, Lee FD y Durston WE. An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* 1973;70:782-6.

Anad CM y Finlayson MC. An Institutional outbreak of salmonellosis due to a lactose fermentative *Salmonella newport*. *Am J Clin Path* 1980;74: 657-60.

Anderson ES. The phage typing of *Salmonella* other than *S. typhi*. En: Van Oye C, editor. *The world problem of salmonellosis*. The Hague: Junk, 1964:84-110.

Andrews WA. Evolution of the Methods for Detection of *Salmonella* in Foods. *J AOAC Int* 1995;79(1): 4-12.

Araj GF, Uwaydah MM y Alami SY. Antimicrobial Susceptibility patterns of bacterial isolates at the American University Medical Center Lebanon. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;20:151-8.

Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth edition. Washington: ASM Press, 1995:190-208.

Archer GL y Mayhall CG. Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1983;151:243-51.

Asensi MD, Costa AP, Moura E, dos Reis EM y Hofer E. Lysotypes and Plasmidial profile of *Salmonella* serovar typhimurium isolated from children with enteric processes in the cities of Rio de Janeiro, RJ, and Salvador; BA-Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995;37(4):297-302.

Aserkoff BA y Bennett JV. Effect of antibiotic therapy in acute Salmonellosis on the fecal excretion of salmonellae. *N Engl J Med* 1969;281(12):636-40.

Avril VL, Denis F, Dobernat H y Monteil H, editores. *Bactériologie Clinique*. Paris: Ellipses, 1992:166-82.

Badalia K, Der-Sarkissian M y Sabetzadeh H. Relation between *Salmonella* typhimurium biotypes and drug resistance, Teheran, Iran (1962-1973). *J Trop Med Hyg* 1976;79(2):28-31.

Baggesen DL, Skov MN, Brown DJ y Bisgaard M. Separation of *Salmonella* DT 2 and DT 135: molecular characterization of isolates of avian origin. *Eur J Epidemiol* 1997;13(3):347-52.

Baggesen DL y Wegener HC. Phage Types of *Salmonella* Enterica ssp. Enterica serovar Typhimurium isolated from production animals and humans in Denmark. *Acta Vet Scand* 1994;35: 349-54.

Balta i Moner J. Hacia un control sanitario de la salmonelosis en las explotaciones avícolas de multiplicación, puesta y producción cárnica. *Eurocarne* 1996;52:55-8.

Barnhart HM, Dreesen DW, Bastien R y Pancorbo OC. Prevalence of salmonella enteritidis and others serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. *J Food Prot* 1991; 54(7):488-91.

Barry AL, Badal RE y Effinger LJ. Reproducibility of three microdilution systems for identification of Enterobacteriaceae, compared with API 20E and Micro-ID systems. *Curr Microbiol* 1979;3:21-5.

Barry AL, Coyle MB, Thornsberry C, Gerlach EH y Hawkinson M. Methods of measuring zones of inhibition with Bauer-Kirby disk susceptibility test. *J Clin Microbiol* 1979;10:885-9.

Baskerville A, Humphrey TJ, Fitzgeorge RB, Cook RW, Chart H, Rowe B y Whitehead A. Airborne infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet Rec* 1992;130(18):395-8.

Bautsch W. Not I macrorestriction analysis suggests a clonal relationship of *Salmonella enterica*, ser. *Enteritidis* phage lysotype 4 strains. *Infection* 1993;21(5):328-30.

Bayley JS. Detection of *Salmonella* Cells within 24 to 36 hours in Poultry Samples with the Polymerase Chain Reaction BAX System. *J Food Prot* 1998;61(7):792-5.

Bean NH, Goulding JS, Lao C y Angulo FJ. Surveillance for foodborne Disease Outbreaks. United States, 1988-1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 1996;45 Supl 5:58-66.

Benenson AS, editor. *Control of Communicable Diseases in Man*. Washington: American Public Health Association 1990;381-5.

Bentley DW, Haque R, Murphy RA y Lepper MH. Biotyping, an epidemiological tool for coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1968;54-9.

Berche P, Simonet M y Gaillard JL, editores. *Bactériologie les bactéries des infections humaines*. Paris: Medicine Sciences Flammarion, 1988;77-92

Bezanson GS, Khakhria R y Bollegraaf E. Nosocomial outbreak caused by antibiotic-resistant strain of *Salmonella typhimurium* acquired from dairy cattle. *Can Med Assoc J* 1983;128:426-7.

Bhatt BD, Zucherman MJ y Foland JA. Disseminated Salmonella arizona infection associated with rattlesnake meat ingestions. *Am J Gastroenterol* 1989; 84:433-5.

Birren B y Lai E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide*. San Diego:Academic Press, Inc., 1993.

Blackburn BO y Ellis EM. Lactose-fermenting Salmonella from dried milk products. *Appl Micro* 1973; 26:672.

Boletín Epidemiológico Semanal. Tipificación de Salmonellas-1984 (I). Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1985;1694:180-1.

Boletín Epidemiológico Semanal. Tipificación de Salmonellas, 1985 (I). Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1986;1752:239-40.

Boletín Epidemiológico Semanal. Tipificación de Salmonellas. 1985 (y II). Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1986;1753:247-8.

Boletín Epidemiológico Semanal. Estudio de las cepas de Salmonella recibidas en el Laboratorio de Referencia al servicio de bacteriología del C.N.M.V.II.S. durante el año 1992. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1993; 1(8):145-68.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de los serotipos de Salmonella aislados en España en el año 1993. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1994;2(9):165-72.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de los serotipos de Salmonella sp aislados en España en el año 1994. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1995;3(15):165-8.

Boletín Epidemiológico Semanal. Alimentos implicados en brotes de salmonelosis en España (1991-1995). Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1996;4(17):137-9.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de los fagotipos de Salmonella serotipo Typhimurium. Año 1994. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1996;4(2):13-6.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de los fagotipos de Salmonella serotipo Typhimurium. Año 1995. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1996;4(18):145-8.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de los serotipos de Salmonella sp aislados en España en el año 1995. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1996;4(15):121-4.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de los serotipos de Salmonella sp aislados de muestras no humanas en 1996 en España. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1996; 5(8):69-76.

Boletín Epidemiológico Semanal. Aumento de Salmonella serotipo Hadar en España en 1996. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1996;4(43):365-8.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de las cepas de Salmonella sp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Año 1996. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1997; 5(3):21-3.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de las cepas de Salmonella sp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 1997. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1998; 6(13) 129-32.

Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de las cepas de Salmonella sp aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 1997. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1998; 6(14):137-44.

Boletín Oficial del Estado N° 89. Real Decreto 851/1975, 20 de Marzo, por el que se establece la reglamentación de las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales.

Boletín Oficial del Estado N° 90. Real Decreto 418/1987, 20 de Febrero, sobre las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales.

Boletín Oficial del Estado N° 183. Real Decreto 1254/1991, 2 de Agosto. Normas para la preparación y conservación de alimentos de consumo inmediato que contengan huevo.

Bouvet P y Grimont D. Augmentation de l'incidence des infection á Salmonella sérotypi Hadar en France. Bulletin épidémiologique Hebdomadaire 1996;32:139-40.

Brisabois A, Cazin I y Breuil E. Surveillance of antibiotic resistance in Salmonella. Eurosurveillance 1997;2(3):19-20.

Brokop CD y Farmer JJ. Typing methods for Pseudomonas aeruginosa. En: Dogett RG, editor. Clinical manifestations of infection and current therapy. New York: Academic Press Inc., 1979:89-133.

Brown DJ, Baggesen DL, Hansen HB, Hansen HC y Bisgaard M. The characterization of Danish isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis by phage typing and plasmid profiling:1980-1990. APMIS 1994;102(3):208-14.

Bryan FL, Ayres JC y Kraft AA. Salmonellae associated with further-processed turkey products. Appl Microbiol 1968;16:1-9.

Bryan FL y Doyle MP. Health Risks and Consequences of Salmonella and Campylobacter jejuni in Raw Poultry. J Food Prot 1995;58:326-44.

Budd W. Typhoid fever: Its nature, mode of spreading, and prevention. London: Longmans publishing, 1873.

Buisson Y. Toxi-infections alimentaires collectives: l'enquête épidémiologique. Ann Gastroentérol Hépatol 1992;28 (6-7):268-73.

Burkhardt F, Schwarzach T y Steidtenl G. Salmonella bruck: A new Salmonella-serotype (6,7:z:1,w). Zbl.Bakt.Hyg., I Abt Orig A 1981; 249:418-20.

Butler DA, Lobregat CM y Gavan TL. Reproducibility of the Analytab (API 20E) systems. *J Clin Microbiol* 1975; 2:322-6.

Buttiaux R, Beerins H y Tacquet A. *Manual de techniques bacteriologiques*. Paris: Flammarion Medicine-Sciences, 1976.

Cadabaj R, Pipova M y Turek P. Poultry, eggs and products of them as source of human salmonellosis in Slovakia. XXV Congress of the World Veterinary Association (Abstracts). Septiembre 3-9, Yokohama, Japón. 1995;133.

Caffer MI y Eiguer T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. *Int J Food Microbiol* 1994;21:15-9.

Campos LC y Hofer E. Antimicrobial resistance among *Salmonella* serovars isolated from different sources in Brazil during 1978-1983. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1989;55(4):349-59.

Caro MR, Masilla BA y Salinas J. *Salmonella*: prevalencia ambiental de diferentes serotipos en mataderos de ganado ovino. *An Vet (Murcia)* 1991; 6-7:31-5

Centers for Disease Control and Prevention. National nosocomial infections study report, annual summary: 1978. 1981;40-2.

Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Salmonella enteritidis* infections in the Northeastern United States. *JAMA* 1987;257:2408-11.

Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. Surveillance, annual summary. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Center for Infectious Disease, Division of Bacterial Diseases. Enteric Disease Branch. 1991.

Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella enteritidis* infection associated with consumption of raw shell eggs. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 1992; 267:3263-64.

Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Salmonella* poona infections-United States and Canada. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 1991;40:549-52.

Chalker RB, Blaser MJ. A review of human salmonellosis: III. Magnitud of *Salmonella* infection in the United States. *Rev Infect Dis* 1988;10:111-24.

Cherubin CE. Antibiotic resistance of *Salmonella* in Europe and the United States. *Rev Infect Dis* 1981;3(6):1105-26.

Cherubin CE. Susceptibility testing, antimicrobial resistance and clinical response in *Salmonella* infections. *Infect Dis Newsl* 1990;9:1-4.

Chrichton PB y Old DC. Differentiation of *Escherichia coli*: multiple typing approach. *J Clin Microbiol* 1980;11:635-40.

Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA y Beachey EH. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983;18:258-69.

Chu G. Pulsed field electrophoresis in contour-calmped homogeneous electric fields for the resolution of DNA by size or topology. *Electrophoresis* 1989;10(5-6):290-5.

Cohen ML y Tauxe R. Drug-resistance *Salmonella* in the United States: An epidemiologic perspective. *Science* 1986; 234:964-9.

Collins CH y Lyme P, editores. *Métodos Microbiológicos*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989:333-57.

Cowden JM, Lynch D, Joseph CA, O`Mahony M, Mawer SL, Rowe B and Bartlett CLR. Case-control study of infections with *Salmonella enteritidis* phage type 4 in England. *Br Med J* 1989;299:771-3.

Craigie J y Yen CH. The demonstration of types of *B. Typhosus* by means of preparation of type II Vi phage. *Can J Public Health* 1938;29:448-63.

Craven PC, Mackel DC, Baine WB, Barker WH, Gangarosa EJ, Goldfield M, Rosenfeld H, Altman R, Lachapelle G, Davies JW y Swanson RC. International outbreak of Salmonella eastbourne infection traced to contaminated chocolate. Lancet. 1975;1:788-93.

D'Aoust JY. Salmonella and the International food trade. Int J Food Microbiol 1994;24:11-31.

D'Aoust JY. Methods for the detection of foodborne Salmonella spp: A review. South Asian J Trop Med Public Health. 1995;26(2):195-208.

D'Aoust JY, Sewel AM, Daley E y Greco P. Antibiotic J Food Prot 1992;55(6):428-34.

Del Rio Mapelli S, Marti Herrero ML y Ramos González JR. Diagnóstico biológico de la fiebre tifoidea. Análisis clínicos 1980;20:217-22.

Dirección General de Salud Pública. Servicio Canario de Salud. Programa de Control de Brotes Epidémicos de Origen Hídrico y Alimentario. 1998.

Directiva de la Comisión 85/429/CEE por la que se modifican los Anexos de la Directiva 79/524/CEE del Consejo relativa a los aditivos en la alimentación animal. DOCE, 11-07-85.

Directiva de la Comisión 97/6/CEE por la que se modifica la Directiva 79/524/CEE del Consejo relativa a los aditivos en la alimentación animal. DOCE, 05-02-97.

Directiva del Consejo 70/524/CEE sobre los aditivos en la alimentación animal. DOCE, 14-12-1970.

Dorn CR, Silapanuntakul R, Angrick EJ y Shipman LD. Plasmid analysis of Salmonella enteritidis isolated from human gastroenteritis cases and from epidemiologically associated poultry flocks. Epidemiol Infect 1993;111(2):239-43.

Doyle ME, Steinhart CE y Cochrane BA, editores. Food Safety. Food Research Institute. University of Wisconsin-Madison. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994:373-93.

Echeita MA y Usera MA. Prevalence of Salmonella serotypes isolated in Spain from human and non human sources (1983-1987). *Microbiología SEM* 1989;5:95-103.

Echeita MA, Díez R y Usera MA. Distribución de los serotipos de Salmonella spp. aislados en España durante un período de 4 años (1993-1996). *Enferm Infecc Microbiol* 1999;17:9-14.

Edel W y Kampelmacher EH. Comparative studies on Salmonella isolation in European laboratories. *Bull W.H.O.* 1968;39:487.

Edel W y Kampelmacher EH. Comparative studies on the isolation of "sublethally injured" salmonellae in nine European laboratories. *Bull W.H.O.* 1973;48:167.

Edelstein PH, Nakahama C, Tobin JO, Dalarco K, Beer KB, Joly JR y Selander RK. Paeleoepidemiologic investigation of Legionnaires' disease at Wadsworth Veterans Administration Hospital by using three typing methods for comparison of Legionellae from clinical and environmental sources. *J Clin Microbiol* 1986;23:1121-26.

Esteban E, Snipes K, Hird D, Kasten R y Kinde H. Use of Ribotyping for Characterization of Salmonella Serotypes. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):233-7.

Fadl AA y Khan MI. Genotypic evaluation of Salmonella enteritidis isolates of known phage types by arbitrary polymerase chain reaction. *Avian Dis* 1997;41(3):732-7.

Falbo V, Caprioli A, Mondello F, Cacace ML, Luzi S y Greco D. Antimicrobial resistance among Salmonella isolates from hospitals in Rome. *J Hyg (lon)* 1982;88(2):275-84.

Falkow S y Mekalanos J. Bacilos entéricos y vibrios. En: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN y Grisberg HS, editores. Tratado de Microbiología. 4ta edición. Barcelona: Masson, 1996:541-66.

Fang FC y Fierer J. Human infection with Salmonella dublin. *Medicine* 1991;70:198-207.

Fantasia M, Filetici E, Anastasio MP, Marcozzi MD, Gramenzi MP y Aureli P. Italian experience in Salmonella enteritidis 1978-1988: characterization of isolates from food and man. *Int J Food Microbiol* 1991;12(4):353-62.

Fantasia M y Filetici E. Salmonella enteritidis in Italy. *Int J Food Microbiol* 1994;21:7-13.

Farhoudi-Moghaddam AA, Katouli M, Jafari A, Bahavar MA, Parsi M y Malekzadeh F. Antimicrobial drug resistance and resistance factor transfer among clinical isolates of salmonellae in Iran. *Scan J Infect Dis* 1990;22:197-203.

Farmer JJ. Conventional typing methods. *J Hosp Infect* 1988;11(Sup. A):309-14.

Farmer JJ y Kelly MT. Enterobacteriaceae. En: Balows A, Herrmann KL, Hausler WJ Jr, Isenberg HD y Shadomy HJ, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington: ASM Press, 1991:360-83.

Felix A y Callow BR. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *Brit Med* 1943;2:127.

Ferron A. *Bactériologie Médicale à l'usage des étudiants en médecine*. 13e. Édition. Paris: Editios Crouan and Roques, 1989:136-143.

Finegold SM y Martin WJ, editores. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ta. Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1983:226-59.

Firstenberg-Eden R. Attachment of bacteria to meat surfaces: A review. *J Food Prot* 1981;44:602-7.

Fisher I. Salm-Net: a network for human salmonella surveillance in Europe. *Eurosurveillance* 1995; 0:7-8.

Fisher IST. Salmonella enteritidis and S. typhimurium in Western Europe for 1993-1995: a surveillance report from Salm-net. *Eurosurveillance* 1997; 2(1):4-6.

Fox MD. Recent trends in salmonellosis epidemiology. *J Am Vet Med Assoc* 1974;165:990-93.

Frazier WC y Westhoff DC, editores. *Microbiología de los Alimentos*. 4ta. Edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993:556-65.

Freeman BA. Bacilos entéricos. Grupo Salmonella. En: *Tratado de Microbiología de Burrows*. 21ª. Edición. Mexico: Interamericana, 1987;517-35.

Frosbisher M, Hinsdill R, Crabtree y Goodheart C. *Microbiología*. Barcelona: Salvat Editores S.A, 1978:510-3.

Frosbisher, M y Fuerts R, editores. *Microbiología de Frosbisher y Fuerts*. 14a edición. Mexico: Interamericana, 1978:294-316.

Gabis DA y Silliker JH. ICMSF. Methods studies II. Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in high-moisture foods. *Cn Microbiol* 1974;20:663.

Galan JE, Pace JH y Hayman MJ. Involvement of the epithelial growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by Salmonella typhimurium. *Nature* 1992;357:588-9.

Galetto, DW, Johnston JL y Archer GL. Molecular epidemiologic of trimethoprim resistance among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob agents Chemother* 1987;31:1683-8.

Gargallo-Viola D. Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 1989;27:860-8.

Gast RK. Detection of *Salmonella enteritidis* in experimentally infected laying hens by culturing pools of eggs contents. *Poult Sci* 1993;72:1454-60.

Gast RK. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infections. *Int J Food Microbiol* 1994;21(12):107-16.

Gast RK y Beard CW. Research to Understand and Control *Salmonella enteritidis* in Chickens and Eggs. *Poult Sci* 1993;72:1157-63.

Gast RK y Benson ST. Intestinal colonization and organ invasion in chicks experimentally infected with *Salmonella enteritidis* phage type 4 and other phage types isolated from poultry in the United States. *Avian Dis* 1996; 40(4):853-7.

Gersema LM y Helling DK. The use of subtherapeutic antibiotics in animal feed and its implications on human health. *Drug Intell Clin Pharm* 1986;20(3):214-8.

Gill CO y Penney N. Penetration of bacteria into meat. *Appl Environ Microbiol* 1977;33(6):1284-6.

Gill CO, Penney N y Nottingham PM. Tissue sterility in unviscerated carcasses. *Appl Environ Microbiol* 1978;36(2):356-9.

Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT 104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998;338(19):1333-8.

Goldman DA y Macone AB. A microbiologic approach to the investigation of bacterial nosocomial infection outbreaks. *Infect Control* 1980;1:391-400.

Gómez Lus, R. Género *Salmonella*. En: Matilla V, Pumarola A, Gómez Lus R, Del Rey Calero J, Rodríguez Torres A, García Rodríguez JA, Piedrola Angulo G y Mira Gutiérrez J, editores. *Microbiología y Parasitología*. Madrid: Amaro Ediciones, 1980:305-14.

González-Hevia MA, Llaneza JJ y Mendoza MC. Usefulness of molecular genetic markers in the typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis causing a food-borne outbreak. *Int J Food Microbiol* 1994;22(2-3):97-103.

González-Hevia MA y Mendoza MC. Polymorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis from a Spanish health area. *New Microbiol* 1995;18(4):377-84.

Gotz M y Juchems R. Myokarditis durch *Salmonella typhimurium*. *Klinl.Wochenschr* 1983;61:1153-7.

Gouws PA, Visser M y Brözel VS. A Polymerase Chain Reaction Procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. *J Food Prot* 1998;61(8):1039-42.

Gray LD. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. En: Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth edition. Washington: American Society for Microbiology, 1995:452-3.

Grimont PAD y Grimont F. Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1978;8:73-83.

Gross U, Tshape H, Bednarek I y Frosch M. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Europ J Clin Microbiol* 1998;17(6):385-7.

Grottolo M y Gomarasca W. Evoluzione del genere *Salmonella* nella provincia di Brescia. Serotipi isolati dal PMIP di Brescia negli anni 1974/92. *Lìgiene Moderna* 1994;101:249-63.

Gruner E, Martinetti L, Hoop RK y Altwegg M. Molecular epidemiology of *Salmonella enteritidis*. *Eur J Epidemiol* 1994;19(1):85-9.

Hargis BM, Caldwell R, Brewer RL, Corrier DE y DeLoach JR. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for Broiler Carcasses. *Poult Sci* 1995;74:1548-52.

Hartstein AI, Valvano MA, Morthland VH, Fuchs PC y Crosa JH. Antimicrobial susceptibility and plasmid profile analysis as identity tests for multiple isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1987;25: 589-93.

Harvey RWS y Price TH. Comparison of Selenite F, Muller-Kauffmann Tetrathionate and Rappaport's medium for *Salmonella* isolation from chicken giblets after pre-enrichment in Buffered Peptone Water. *J Hyg Camb* 1981;87:219-24.

Hawkey PM. Molecular methods for the investigation of bacterial cross-infection. *J Hosp Infect* 1987;9: 211-8.

Hébert GA, Cooksey RC, Clark NC, Hill BC, Jarvis WR y Thornsberry. Biotyping coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1950-6.

Hedberg CW, White KE, Johnson JA et al. An outbreak of *Salmonella enteritidis* infection in a fast-food restaurant: Implications for foodhandler-associated transmission. *J Infect Dis* 1991;164:1135-40.

Herffernan HM. Antibiotic resistance among *Salmonella* from human and other sources in New Zealand. *Epidemiol Infect* 1991;106:17-23.

Hernández T, Arias A, Alvarez-Rodríguez C, Arévalo MP, Lecuona M y Sierra A. Frequency of *Salmonella* in chicken thighs. *J Food Safety* 1999 (En prensa).

Hickman-Brenner FW, Stubbs AD y Farmer JJ. Phage Typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. *J Clin Microbiol* 1991;29(12):2817-23.

Hoben DA, Ashton DH y Peterson AC. Some observations on the incorporation of Novobiocin into Hektoen Enteric Agar for improved *Salmonella* isolation. *Appl Microbiol* 1973;76(1):126-7.

Hogue AT, White PL y Hemnover JA. Pathogen reduction and Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) systems for meat and poultry. USDA. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1998;14(1):151-64.

Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-Brenner FW y Cohen ML . Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterization *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J Clin Microbiol* 1984;19:100-4.

Holt PS. Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella enteritidis* infection. *Avian Dis* 1993;37:412-7.

Holt PS, Mitchell BW y Gast RK. Airborne horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in molted laying chickens. *Avian Dis* 1998;42(1):45-52.

Hopper SA y Mawer S. *Salmonella enteritidis* in a commercial layer flock. *Vet Rec* 1988;123:351.

Hornick RB. Fiebre tifoidea. En: *Tratado de Enfermedades Infecciosas de Hoeprich*. Barcelona: Salvat Editores, 1982:557-67.

Humphrey TJ. *Salmonella*, *Campylobacter* and Poultry: possible control measures. *B Hyg Trop Dis* 1989;64(7):32-9.

Humphrey TJ. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. *Int J Food Microbiol* 1994;21(1-2):31-40.

Humphrey TJ, Baskerville A, Mawer S, Rowe B y Hopper S. *S enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs:a study involving naturally infected hens. *Epidemiol Infect* 1989;103:415-23.

Hunter PR y Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26:2465-66.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) of the International Association of Microbiological Societies. *Salmonelas*. En: *Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 1983:163-75.

Irino K, Fernandes SA, Tavechio AT, Neves BC y Dias AM. Progression of Salmonella enteritidis phage type 4 strains in Sao Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1996;38(3):193-6.

James WO, Prucha JC, Brewer RL, Williams WO Jr, Christensen WA, Thaler AM y Hogue AT. Effects of countercurrent scalding and postscald spray on the bacteriologic profile of raw chicken carcasses. J Am Vet Med Assoc 1992;201(5):705-8.

Jarvis B. A philosophical approach to rapid methods for industrial food control. En: Habermehl KO, editor. Rapid methods and Automation in Microbiology and Immunology. New York: Editorial Springer-Verlag, 1984:593.

Jenner W. On the identity or non-identity of typhoid and typhous fevers. London: C & J Adlard, 1850.

Joklik WK, Willet HP y Amos DB, editores. Microbiología de Zinsser. 18va. Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1986:708-17.

Jones RN. The antimicrobial susceptibility test: rapid and overnight, agar and broth, automated and conventional, interpretation and trend analysis. En: Lorian A, editor. Significance of medical microbiology in the care of patients, 2nd ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1982.

Katouli M, Seuffer RH, Wollin R, Kuhn I y Mollby R. Variations in biochemical phenotypes and phage types of Salmonella enteritidis in Germany 1980-92. Epidemiol Infect 1993;111(2):199-207.

Khakhria R, Duck D y Lior H. Distribution of Salmonella enteritidis phage types in Canada, 1983-92. Epidemiol Infect 1991;106(1):25-32.

Khakhria R, Woodward D, Jhonson WM y Poppe C. Salmonella isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. Epidemiol Infect 1997;119(1):15-23

Kelterborn E. On the frequency of occurrence of Salmonella species. An analysis of 1.5 million strains of salmonellae isolated in 109 countries during the period 1934-1975. *Zbl Bakteriol Hyg I Abt Orig A* 1979;243:289-307.

Kohbata S, Takahashi M y Yabuchi E. Lactose-fermenting, multiple drug-resistant Salmonella typhi strains isolated from a patient with postoperative typhoid fever. *J Clin Microbiol* 1983;18(49):920-5.

Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, Lavenia A, Di Michele M, Tommasini T y Monti-Bragadin C. PCR Ribotyping for Characterizing salmonella Isolates of Different Serotypes. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):2440-3.

Lahellec C y Colin P. Influence of processing on Salmonella contamination of poultry; possibilities of improvements. En: Snoyenbos GN, editor. *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*. New Orleans, LA. 1984.

Lahellec C, Colin P, Bennejean G, Paquin J, Guillerm A y Debois JC. Influence of resident Salmonella on contamination of broiler flocks. *Poult Sci* 1986;65(11):2034-9.

Landeras E, González-Hevia MA, Alzugaray R y Mendoza MC. Epidemiological Differentiation of Pathogenic Strains of Salmonella enteritidis by Ribotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2294-6.

Lee LA, Puhr ND, Maloney EK, Bean NH y Tauxe RV. Increase in antimicrobial-resistant Salmonella infections in the United States, 1989-1990. *J Infect Dis* 1994;170(1):128-34.

Lee R, Peppe J y George H. Pulse-Field Gel electrophoresis of Genomic Digests Demonstrates Linkages among Food, Food Handlers, and Patrons in a Food-Borne Salmonella javiana Outbreak in Massachusetts. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):284-5.

Le Minor L. Salmonella. En: Le Minor L y Véron M, editores. *Bactériologie médicale*. Paris: Flammarion médecine sciences, 1982:259-76.

Le Minor L Chamoiseau G, Barbe E, Charlie Ch y Egron L. Dix nouveaux serotypes de Salmonella isoles au Tchad. Ann Institut Pasteur 1969;116:775-80.

Le Minor L y Bockemuhl J. Supplement XXIII (1979): au schema de Kauffmann-White. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 1980;131B:185-90.

Le Minor L y Bockemuhl J. Supplement XXIV (1980) au schema de Kauffmann-White. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 1981;132A:85-9.

Le Minor L y Bockemuhl J. Supplement XXVI (1982) au schema de Kauffmann-White. Ann.Microbiol (Inst.Pasteur) 1983;134B:323-8.

Le Minor L; Bockemuhl J; Aleks S y Popoff M. Guidelines for the preparation of Salmonella antisera. 4th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur Paris. 1983.

Le Minor L, Bockemuhl J y Rowe B. Supplement XXV (1981) au schema de Kauffmann-White. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 1983;134A:107-10.

Le Minor L, Coynault C y Pessoa G. Determinisme plasmidique du caractere atypique (lactose positif) de souches de S. typhimurium et S. oranienburg isolees au Bresil lors d'epidemies de 1971-1973. Ann Micobiol (Inst. Pasteur) 1974;125A:261-85.

Le Minor L, Le Minor S, Doutre M, Sansonnins R, Papa F, Lhuillier M, Meyran M, Le Priol, Beaud R, Laurint B, Dinllis D y Miras I. Neuf nouveaux serotypes de Salmonella isolesi in Afrique et aux Antilles. Bull Soc Path Exot 1981;74(2):149-54.

Le Minor L, Veron M y Popoff M. Proposition pour une nomenclature des Salmonella. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 1982a;133B:245-54.

Le Minor L, Veron M y Popoff M. Taxonomie des Salmonella. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 1982b;133B:223-43.

Le Minor, L. Salmonella. En: Daguet GL. Técnicas en Bacteriología. I. Aerobios. Barcelona: Ed. Jims, 1977:241-59.

Le Minor, L. Salmonella. En: Krieg NR y Holt JG, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. London: Williams y Wilkins, 1984;I: 427-58.

Lhuillier M y Zeller H. 26 serotypes de Salmonelles nouveaux pour Madagascar isoles de differentes especes animales. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1977;46: 61-72.

Liebisch B y Schwartz S. Molecular typing of Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Enteritidis isolates. *J Med Microbiol* 1996;44(1):52-9.

Lillar HS, Blankenship LC, Dickens JA, Craven SE y Shackleford AD. Effect of acetic acid on the microbiological quality of scalded picked and unpicked broiler carcasses. *J Food Prot* 1987;50:112-4.

Lindberg AA y Le Minor L. Serology of Salmonella. En: Began T, editor. *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1984;15(1):1-43.

Lior H y Khakhria R. Canada's most common Salmonella serotypes and Salmonella enteritidis phagetypes (1990-91). *Safety Watch* 1992;27:3.

Lister SA. Salmonella enteritidis infection in broilers and broiler breeders. *Vet Rec* 1988;123:350.

López-Brea M, Meseguer MA y Baquero M. Frecuencia de aislamiento en coprocultivo y hemocultivo de las distintas especies del género Salmonella. Madrid: *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 1980.

Lorian V. Salmonella susceptibility patterns in hospitals from 1975 through 1984. *J Clin Microbiol* 1986;23:826-7.

Louis PCA. Recherches anatomiques, pathologiques et therapeutique sur la maladie connue sous les noms de gastroenterite, fièvre putride, adynamiques, ataxique, typhoïde, comparee avec les maladies aigües les plus ordinaires. Paris: J-B Balliere, 1829.

Luque A, Moriñigo MA, Rodríguez-Avial, Picazo JJ y Borrego JJ. Resistencias a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de Salmonella aisladas de diferentes orígenes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12:187-92

MacDonald KL, Cohen ML, Hargrett-Bean NT, Wells JG, Puhr ND, Collin SF y Blake PA. Changes in antimicrobial resistance of Salmonella isolated from humans in the United States. *JAMA* 1987;258(11):1496-9.

Machida K y Shigiyama Y. Antibiotic susceptibilities of human salmonella isolants from 1975 to 1986. *Jiketai Med J* 1988;35:151-8.

McGarr C, Mitchell WR, Carlson HC y Fish NA. Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolates from broiler chicken industry in Ontario. *Can J Comp Med* 1977;41(1):107-11.

Manso R, Pérez ML, Delgado MJ, González D, Fernández-Cuesta D, León MP y Moreno E. Estudio bacteriológico de canales de pollo refrigeradas. *Alimentaria* 1987;11:11-3.

Manual BAXTER. Paneles Gram negativos deshidratados manual de utilización. Deerfield: Baxter Diagnostic, Inc., 1992.

Manual DIFCO. Detroit: Difco Laboratories Inc., 1994.

Manual OXOID. Hampshire: Oxoid Limited, 1991

Martin SM, Hargrett-Bean N y Tauxe RV. An Atlas of Salmonella in the United States: Serotype-specific surveillance 1968-1986. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control. 1987.

Maslen LGC. A new medium for differentiation of urease producers microorganisms. *Br Med J* 1956;2:545-6.

Maslow JN, Slutsky AM y Arbeit RD. The application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC

y White TJ, editores. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington: American Society of Microbiology, 1993.

Matushek M, Bonten MJM y Hayden MK. Rapid preparation of Bacterial DNA for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2598-600.

Mayer, LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol* 1988;31:390-4.

McConnell CG, Kauffmann AF y Gangarosa EJ. Epidemiology of an International outbreak of *Salmonella agona*. *Lancet* 1973;2: 490-3.

McIlroy SG, McCracken RM, Neill SD y O'Brien. Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler breeder flocks. *Vet Rec* 1989;125:545-8.

McMeekin TA y Thomas CJ. Retention of bacteria on chicken skin after immersion in bacterial suspensions. *J Appl Bacteriol* 1978;45: 383-7.

Meitert T y Meitert E. Usefulness, applications, and limitations of epidemiological typing methods to elucidate nosocomial infections and the spread of communicable diseases. En: Bergan T y Norris JR, editores. *Methods in Microbiology*. Londres: Academic Press Inc., 1978.

Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992;174:1-7.

Mengert U y Fehlhaber K. Effect of premortal stress on the endogenous microbial contamination of broiler carcasses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1996;109(1):28-31.

Mickelsen PA, Plorde JJ, Gordon KP, Hargiss C, McClare J, Schoenknecht FD, Condie F, Tenover FC y Tompkins LS. Instability of antibiotic resistance in a strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. *J Infect Dis* 1985;152: 50-8.

Miller SI, Hohmann EL y Pegues DA. Salmonella (including Salmonella typhi). En: Mandell GL, Bennett JE y Dolin R, editores. Principles and Practice of Infections Diseases. Fourth edition. New York: Churchill Livingstone, 1995:2013-33.

Mishu B, Griffin PM, Tauxe RV, Cameron DN, Hutcheson RH y Schaffner W. Salmonella enteritidis gastroenteritidis transmitted by intact chicken eggs. Ann Intern Med 1991;115(3):190-4.

Miyamoto T, Tian HZ, Okabe T, Trevanich S, Asoh K, Tomoda S, Honjoh KI y Hatano S. Application of Random Amplified Polymorphic Dna Analysis for Detection of Salmonella spp. in foods. J Food Prot 1998;61(7):785-91.

Morris GK, McMurray BL, Galton MM y Wells JC. A study of the dissemination of salmonellosis in a commercial broiler chicken operation. Am J Vet Res 1961;30:1413-21.

Morris JG, Dwyer DM, Hoge CH W, Stubbs AD, Tilghman D, Groves C, Israel E y Libonati JP. Changing clonal patterns of Salmonella enteritidis in Maryland: Evaluation of strains isolated between 1985 and 1990). J Clin Microbiol 1992;30(5):1301-3.

Mossel DAA y Moreno García B. Enfermedades de origen microbiano transmitidas por alimentos. Editorial Acirbia S.A. Zaragoza. 1985:11-4.

Moustardier G. Bacteriologie Medicale. Paris: Librairie Maloinle S.A. Editeur, 1976;698-722.

Mulder RWAW. Safe poultry meat production in the next century. Acta Vet Hung 1997;45(3):307-15.

Mulder RWAW, Dorresteyn LWJ, Hofmans GJP, Veerkamp CH. Experiments with continuous immersion chilling of broiler carcasses according to the code of practice. J Food Sci 1976;41:438-42.

Mulder RWAW, Dorresteyn LWJ, Van Der Broek J. Cross-contamination during the scalding and plucking of broilers. British Poult Sci 1978;19:61-70.

Muñoz P, Díaz MD, Rodríguez-Crélixems M, Cercenado E, Peláez T y Bouza E. Antimicrobial resistance of Salmonella isolates in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(5):1200-2.

Murase T, Nakamura A, Matushima A y Yamai S. An Epidemiological study of Salmonella enteritidis by pulsed field gel electrophoresis (PFGE): several PFGE patterns observed in isolates from a food poisoning outbreak. *Microbiol Immunol* 1996;40(11):873-5.

Murray PR. Standardization of the Analytab Enteric (API 20E) Systems to increase accuracy and reproductibility of the test for biotype characterization of bacteria. *J Clin Microbiol* 1978;8:46-9.

Murray PR, Pfaller MA, Kobayashi GS y Rosenthal KS. Enterobacteriaceae. En: *Microbiología Médica*. 2da. Edición. Madrid: Hartcourt Brace, 1997:227-40.

Nair US, Saeed AM, Muriana PM, Kreisle RA, Barrett B, Sinclair CL y Fleissner ML. Plasmid profile and resistance to antimicrobial agents among Salmonella enteritidis isolates from human beings y poultry in the midwestern United States. *JAVME* 1995;206(9):1339-44.

Nastasi A y Mammina C. Epidemiology of Salmonella enterica serotype Enteritidis infections in southern Italy during the years 1980-1994. *Res Microbiol* 1996;147:393-403.

Nastasi A, Mammina C y Villafrate MR. Epidemiology of Salmonella typhimurium: ribosomal analysis of strains from human and animal sources. *Epidemiol Infect* 1993;110:553-65.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1984.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Standards methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria which grow aerobically.

Approved standard M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1985.

News and views: Omelettes without broken eggs?[editorial]. *Nature* 1988;336:699-700.

North WR. Lactose pre-enrichment method for isolation of *Salmonella* from dried egg albumen: its use in a survey of commercially produced albumen. *Appl Microbiol* 1961;9:188.

Nottermans S y Kampelmacher EH. Heat destruction of some bacterial strains attached to broiler skin. *British Poult Sci* 1975;16:351-61.

Nottermans S y Hoogenboom-Verdegaal. Existing and emerging foodborne diseases. *Int J Food Microbiol* 1992;15:197-205.

O'Brien JDP. Aspects of *Salmonella enteritidis* control in poultry. *Worlds Poult Sci J* 1990;46:119-24.

O'Brien JDP. *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Vet Rec* 1988;122:214.

Oboegbulem SI, Collier PW, Sharp JCM y Reilly WJ. Epidemiological aspects of outbreaks of food-borne salmonellosis in Scotland between 1980 and 1989. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1993;12(3):957-67.

Olsen JE, Brown DJ, Skov MN y Christensen JP. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Vet Quart* 1993;5(4):125-34.

Oosterom J. *Epidemiology of Campylobacter jejuni*. Utrecht: Drukkerij Elinkwijk, 1985.

Organización Mundial de la Salud (OMS). *Serie de Informes Técnicos* 1978:624.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Outbreak of quinolone-resistant, multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104, Denmark. *Weekly Epidemiol Rec* 1998;42:327-8.

Pace JH, Hayman MJ y Galan JE. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1993;72:505-14.

Padrón M. *Salmonella typhimurium* penetration through the egg-shell of hatching eggs. *Avian Dis* 1990;34:463-5.

Papadakis JA, Trichopoulos D, Papaiconomou N, Karalis D y Vassiliadis P. Un nouveau serotype de *Salmonella* du Sous-ginre II isole in Grece: *Salmonella* 3,10:z:1,5. *Bull Soc Path Exot* 1975;68:151-2.

Parisi JT. Coagulase-negative staphiloccoci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol Rev* 1985;49:126-39.

Parisi JT y Hecht DW. Plasmid profiles in epidemiologic studies of infections by *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1980;141:637-43.

Pascual Anderson MR. *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1992:37-50.

Patterson JT. Airborne microorganisms in poultry processing plants. *Br Poultry Sci* 1973;14:161-5.

Pedro-Pons A, Farreras Valinti P, Foz Tinla A, Suros Forns J, Surinyach Oller R y Frouchman Rager R. *Tratado de Patología y Clínicas Médicas. Tomo VI*. Barcelona: Salvat Editores, S.A., 1975: 244-95.

Perea E. *Enfermedades Infecciosas. Patogénesis y Diagnóstico*. Barcelona: Salvat Editores, S.A., 1983:682-703.

Pérez de León A, Pérez C, Ferrer D, Jordan M y Gobernado M. *Salmonella*: resistencias frente a 3 antibióticos de elección. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990;8:446-8.

Peterson NJ (1986): Salmonella toxins. Pharmacology of bacterial toxins. New York. Pergamon Press, 1986:227-234.

Pfaller MA. Typing methods for Epidemiology Investigation. En: Ballows A, Hausler WJ Jr., Shadomy HJ, Herrmann KL e Iseberg HD, editores. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press, 1991:171-82.

Pffeifer R y Kalle W. Experimentelle untersuchungen zur Frage der Schitzimpfung des Menschen gegen typhus abdominalis. Dtsch Med Wochenschr 1896;22:735.

Plummer RAS, Blissett SJ y Dodd CER. Salmonella contamination of Retail Chicken Products Sold in the UK. J Food Prot 1995;58(8):843-6.

Podzorski R y Persing DH. Molecular detection and identificación of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC y Tenover FC, editores. Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition. Washington: ASM Press, 1995:130-7.

Pohl P, Lintermans P, Schlicker C, Chasseur MI, Ghysels G y Rowe B. Epidemiologie des souches de Salmonella typhimurium biotype 6 isolees in Belgique de 1969 a 1982. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 1983;134A:319-28.

Pohl P, Lintermans P, Schlicker C, Ghysels G y Chasser-Libotte ML. Salmonella des animaux, des viandes et de farines, isolees in Belgique au cours de 1983 serotypes, biotypes et resistance. Ann Med Vet 1984; 128:211-9.

Poole L y Borchers M. Some common basic programs. Berkeley, California, Adam Osborne & associates, Inc. 1977.

Poppe C. Salmonella enteritidis in Canada. Int J Food Microbiol 1994;21:1-5.

Poppe C, Irwin RJ, Forsberg CM, Clarke RC y Oggel J. The prevalence of Salmonella enteritidis and other Salmonella spp. among Canadian registered commercial layer flocks. Epidemiol Infect 1991;106(2):259-70.

Poppe C, McFadden KA, Brouwer AM y Demezuk W. Characterization of *Salmonella enteritidis* strains. *Can J Vet Rev* 1993;57(3):176-84.

Poppe C, McFadden KA y Demezuk W. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. *Int J Food Microbiology* 1996;30:325-44.

Powell NG, Threlfall EJ, Chart H y Schofield SL. Correlation of change in phage type with pulsed field profile and 16S rRNA profile in *Salmonella enteritidis* phage types 4, 7 and 9 a. *Epidemiol Infect* 1995;114:403-11.

Pozo Lora R. Microbiología de los productos cárnicos. Ponencia en el Curso de Microbiología de los Alimentos. Colegio Oficial de Veterinarios de Navarra. Pamplona. 1984.

Pumarola A. *Salmonella*. En: Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García Rodríguez JA y Piedrola Angulo G, editores. *Microbiología y Parasitología Médica*. Barcelona: Salvat Editores, S.A., 1984;37:405-13.

Puohiniemi R, Heiskanen T y Siitonen A. Molecular epidemiology of two international sprout-borne *Salmonella* outbreaks. *J Clin Microbiol* 1997;35(10):2487-91.

Ramos JM, Alés JM, Cuenca-Estrella M, Fernández-Roblas R y Soriano F. Changes in susceptibility of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella virchow* to six antimicrobial agents in a Spanish hospital, 1980-1994. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15(1):85-8.

Ramos JM, Cuenca-Estrella M, Alés JM y Soriano F. Perfil epidemiológico de la salmonelosis no tifoidea en un hospital del área urbana de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol* 1996;14:345-51.

Rappaport F, Konkori N y Navon B. A new enrichment medium for certain *Salmonellae*. *J Clin Path* 1956;9:261-6.

Ravenholt O, Schmutz CA, Empey LC, Maxson DJ, Klouse PL y Bryant AJ. Salmonellosis associated with thanksgiving dinner Nevada. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 1996;45(46):1026-27.

Reeve ECR y Braithwaite JA. Lac+ plasmids are responsible for the strong lactose-positive phenotype found in many strains of Klebsiella species. Genet Res 1973;22:329-33.

Reeves P. Bacteriocins. Bacteriol Rev 1965;29:25-45.

Reglamento 2821/98/CE del Consejo de la Unión Europea. DOCE, 29-12-98.

Restaino L y Komatsu KK. Determination of effectiveness of Novobiocin added to two agar plating media for the isolation of Salmonella from various fresh meat products. J Food Saf 1982;3:183-92.

Restaino L, Komatsu KK y Syracuse MJ. A note on Novobiocin in XLD and HE agars: the optimum levels required in two commercial sources of media to improve isolation of Salmonella. J Appl Bacteriol 1982;53:285-8.

Rivera MJ, Rivera N, Castillo J, Rubio MC y Gómez-Lus R. Molecular and Epidemiological Study of Salmonella Clinical Isolates. J Clin Microbiol 1991;29(5):927-32.

Roberts D. Salmonella in chilled and frozen chicken. Lancet 1991;337(8747):984-5.

Rodrigue DC, Cameron DN, Puhr ND, Brenner FW, St Louis ME, Wachsmuth y Tauxe RV. Comparison of Plasmid Profiles, Phage Types, and Antimicrobial resistance Patterns of Salmonella enteritidis in the United States. J Clin Microbiol 1992;30:854-7.

Rodrigue DC, Tauxe RV y Rowe B. International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic?. Epidemiol Infect 1990;105(1):21-7.

Rosner BA. Fundamentals of biostatistic. Boston:Duxbury Press. 1982.

Rowe B. Salmonella hadar. England and Wales. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 1980;29:506-8.

Saitanu K, Koowatananukul C, Jerngklinchan J y Sasipreeyajan J. Detection of Salmonella in hen eggs in Thailand. Southeast Asian J Trop Public Health 1994;25(2):324-7.

Sakai T y Chalermchaikit G. The major sources of Salmonella enteritidis in Thailand. Int J Food Microbiol 1996;31:173-80.

Salmonella hadar associated with pet ducklings-Conneticut, Maryland and Pennsylvania [editorial]. JAMA 1992;267:2011.

Sanderson KE y Roth JR. Linkage map of Salmonella typhimurium. Edition VII. Microbiol Rev 1988;52:485-532.

Schaberg DR, Rubens CE, Alford RH, Farmer WE, Schaffner W y McGee ZA. Evolution of antimicrobial resistance in nosocomial infection-lessons from the Vanderbilt experience. Am J Med 1981;70:445-8.

Schartenberg-Samman H. Salmonellen und ihr Resistenzverhalten gegenüber neueren und älteren chemotherapeutischen Substazen. Dissertation. Frankfurt, Germany.

Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL y Wong ACL. Growth and penetration of Salmonella enteritidis, Salmonella heidelberg and Salmonella typhimrium in eggs. Int J Food Microbiol 1995;24:385-96.

Schutze GE, Flick EL, Pope SK, Lofgren JP y Kirby R. Epidemiology of Salmonellosis in Arkansas. Southern Med J 1995;88(2):195-9.

Schwartz DC y Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. Cell 1984;37:67-75.

Scuderi G, Fantasia M, Filetici E y Anastasio MP. Foodborne outbreaks caused by Salmonella in Italy, 1991-4. Epidemiol Infect 1996;116(3):257-65.

Sharma PL, Sharma KB y Prakash K. Colicin production and coexistence of Col (+) plasmid with R-plasmid. *Indian J Med Res.* 1984;79:591-3.

Sharp JCM. Foodborne infections and Poultry. *J Roy Soc Health* 1991:35-7.

Skazaki R, Tamura K, Abe H, Ogawa Y y Miyata Y. A new Salmonella serovar: *Salmonella itami* (9,12:1,z 13:1,5). *Jpn J Med Sci Biol* 1981;34(3):179-80.

Slavik Mf, Km JW y Walker JT. Reduction of Salmonella and Campylobacter on Chicken Carcasses by changing Scalding Temperature. *J Food Prot* 1995;58(6):689-91.

Smith AL. *Fundamentos de Microbiología*. 8va. Edición. Pamplona: Eunsa, S.A., 1977:450-69.

Smith CL, Kelco SR y Cantor CR. Pulsed field gel electrophoresis and the tecnology of large DNA molecules. En: Davies K, editor. *Genome analysis: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1988.

Snoeyenbos GH, Smyser CF y Van Rockel H. Salmonella infections of the ovary and peritoneum of chickens. *Avian Dis* 1969;13:688-70.

Spillman S y Ehram M. Zur epidemiologie der Salmonellen-infektionen beim Mastgeflugel. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1983;125(7):423-31.

St Louis ME, Morse DL, Potter E, DeMelfi TM, Guzewich JJ, Tauxe V y Blake PA. The emergence of Grade A eggs as a major source of Salmonella enteritidis infections. *JAMA* 1988;259:2103-7.

Stewart DJ. The occurrence of enteropathogenic E. coli and Salmonellae in processed broilers. *Proc First Int Congr Food Sci Technol* 1965;2:485-90.

Struelens MJ. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogen: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(5):581-5

Struelens MJ and the members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), of the European Society for Clinical Microbiology and

Infectious Diseases (ESCMID). Consensus guidelines for appropriated use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. ESCMID Study Group Report. *Clin Microbiol Infect* 1996;2(1):2-11.

Struelens MJ, De Gheldre Y y Deplano A. Comparative and library epidemiological typing systems: outbreaks investigations versus surveillance systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19(8):565-9.

Stull TL, LiPuma JJ y Edlind TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J infect Dis* 1988;157:280-6.

Suzuki Y, Ishihara M, Matsumoto M, Arakawa S, Saito M, Ishikawa N y Yokochi T. Molecular epidemiology of *Salmonella enteritidis*. An outbreak and sporadic cases studied by means of pulsed-field gel electrophoresis. *J Infect* 1995;31(3):211-7.

Swaminathan B y Matar GM. Molecular Typing Methods. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC y White TJ, editores. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles y Applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993:26-50.

Tacket CO. Molecular epidemiology of *Salmonella*. *Epidemiol Rev* 1989;11: 99-108.

Tamura K, Kuramochi S, Sakazaki R, Yoshimura H y Sato S. A new *Salmonella* serovar: *Salmonella ibaragi* (21:y:1,2) in Japan. *J Med Sc Biol* 1983;36(1):47-8.

Tanphaichitra D, Srimuang S, Chiaprasittigul P, Minlday P y Christensen OE. The combination of Puvmecillinam and Pivampicillin in the treatment of Enteric Fever Infection 1984;12(6):381-3.

Tauxe RV, Hassan LF, Findeisen KO et al. Lack of transmission to patients. *Rev Infect Dis* 1988;157:370-3.

Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AM e Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996;38(5):315-22.

Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, et al. Salmonellosis associated to marijuana. *N Engl J Med* 1982;306:1249-53.

Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, Schmidt EV, Barrett JJ, Schrader JS, Schrader Cs, McGee HB, Feldman RA y Brinner DJ. Salmonellosis in a day-care center. *N Engl J Med* 1982;306:1249-53.

Taylor WI. Isolation of Shigella. Xilose lysine agars; new media for isolation of enteropathogens. *Am J Clin Path* 1965;44:471-5.

Tenover FC. Introduction to Molecular Biology Techniques. En: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 1. Sup.1. Washignton: American Society for Microbiology, 1992;10.1.1-10.1.5.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH y Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel electrophoresis: Criteria for bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.

Tessi MA, Salsi M, Caffer Mi y Moguilevsky MA. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. *J Food Prot* 1997;60(8):1001-5.

Thomas CJ y McMeekin TA. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopy study. *Appl Environ Microbiol* 1980;40:133-44.

Thomas CJ y McMeekin TA. Attachment of Salmonella spp. to chicken muscle surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1981;42:130-4.

Thomas CJ y McMeekin TA. Effect of water immersion on the microtopography of the skin of chicken carcasses. *J Sci Food Agr* 1982;33:549-54.

Thomas CJ, McMeekin TA y Patterson JT. Prevention of microbial contamination in the poultry processing plant. En: Smulders FJA, editor. *Elimination of Patogenic Organisms from Meat and poultry*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987.

Threlfall EJ, Hall MLM y Rowe B. Lactose-fermenting Salmonellae in Britain. *Fems Microbiol Lett* 1983;17:127-30.

Threlfall EJ, Hampton MD, Chart H y Rowe B. Use of plasmid profile typing for surveillance of Salmonella enteritidis phage type 4 from humans, poultry and eggs. *Epidemiol Infect* 1994;112(1):25-31.

Threlfall EJ, Ward LR y Rowe B. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic Salmonella Typhimurium DT 104 in England and Wales. *Eurosurveillance* 1997;2(11)81-4.

Threlfall EJ, Rowe B y Ward LR. A comparison of multiple drug resistance in salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. *Epidemiol Infect* 1993;111(2):189-97.

Threlfall EJ, Ward LR, Skinner JA y Rowe B. Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. *Microb Drug Resist* 1997;3(3):263-6.

Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P y Pang T. Molecular analysis of Salmonella enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1070:4.

Thong KL, Puthuchery S y Pang T. Outbreak of Salmonella enteritidis Gastroenteritis: Investigation by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Int J Infect Dis* 1998;2(3):159-63.

Tietjen M y Fung DYC. Salmonellae and Food Safety. *Crit Rev Microbiol* 1995;1:1-31.

Timoney JF, Shivaprasad HL, Baker RC y Rowe B. Egg transmission after infection of hens with Salmonella enteritidis phage type 4. *Vet Rec* 1989;125:600-1.

Todd E. Epidemiology of Foodborne illness: North America. *Lancet* 1990;336:788-90.

Usera MA, Cano R y Echeita A. Análisis de los serotipos de Salmonella sp. Aislados en España en el período 1988-1992. *Enfer Infecc Microbiol Clin* 1995;13(2):138-45.

Usera MA, Popovic T, Bopp CA y Strockbine NA. Molecular subtyping of Salmonella enteritidis phage type 8 strains from the United States. *J Clin Microbiol* 1994;32(1):194-8.

Usera MA, Rodríguez A, Echeita A y Cano R. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17(8):551-5.

Usera MA, echeita A, Aladuenas A, Blanco MC, Reymundo R, Prieto MI, Tello O, Cano R, Herrera D y Martínez-Navarro F. *Eur J epidemiol* 1996;12(4):377-81.

Vaillant V, Haeghebaer S, Desinclos JC, Bouvet P, Grimont F, Grimont FA y Burnens AP. Outbreak of Salmonella dublin Infection in France, November-December 1995. *Eurosurveillance* 1996; 2: 9-10.

Van de Giessen AW, Ament AJHA y Notermans SHW. Intervention strategies for Salmonella enteritidis in poultry flocks: a basic approach. *Int J Food Microbiol* 1994;21:145-54.

Van de Giessen AW, Peters R, Berkers PA, Jansen WH y Nottermans SH. Salmonella contamination of poultry flocks in the Netherlands. *Vet Q* 1991;13(1):41-6.

Van Schothorts M y Rinaud AM. Dynamics of Salmonella isolation with modified Rappaport's medium (R10). *J Appl Bact* 1983;54:209-15.

Vassiliadis P, Paterak E, Papaiconomou N, Papadakis JA Trichopoulos D (1976). *Annales de Microbiologie (Institute Pasteur)* 127 B:195-200

Vassiliadis P, Trichopoulos D, Papadakis J y Le Minor L. Un nouveau serotype de Salmonella isole in Grece: Salmonella atinai = 6,7:i:e,n,z15. *Ann Microbiol (Inst. Pasteur)* 1974;125A:127.

Velasco Martin A, Jimino Carruea A y Carrasco A. Salmonelosis: tratamiento. *Pathos* 1982;31:15.

Vicente AC y Almeida DF. Identification of multiple-resistance (R) and colicinoginly (Col) plasmids in an epidemic Salmonella agona serotype in Rio de Janeiro. *J Hyg* 1984;93(1):79-84.

Vinhas SA y Almeida DF. Plasmid-mediated antibiotic resistance and colicinoginly among Salmonellae in Rio de Janiero, Brazil. *An Acad Brasil Cienc* 1984;56(3):319-22.

Wachsmuth K. Genotypic approaches to the diagnosis of bacterial infections: plasmid analyses and genes probes. *Infect Control* 1985;6:100-9.

Wagner DE y McLaughlin S. Salmonella surveillance by the Food and Drug Administration: A review 1974-1985. *J Food Prot* 1986;49(9):734-8.

Waterman SH, Jaurez G y Carr SJ. Salmonella arizona infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. *Am J Public Health* 1990;80:286-9.

World Health Organization (WHO). *Weekly Epidemiol Rec.* 1998;73, 327-8.

World Health Organization (WHO) Scientific Working Group on Monitoring and Management of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Bacterial, viral diseases and immunology.* Geneva:WHO,1994 WHO/CDS/BVI/95.7.

Weikel CS y Guerrant RL. Nosocomial salmonellosis. *Infect Control* 1985;6:218-20.

White PL, Baker AR y James WO. Strategies to control Salmonella and Campylobacter in raw poultry products. *Rev Sci Tech* 1997;16(2):525-41.

Wiesmann E. *Microbiología médica.* Barcelona: Salvat Editores S.A., 1974:75-83.

Williams JE, Dillard LH y Hall GO. The penetration patterns of Salmonella typhimurium through the outer structures of chicken eggs. *Avian Dis* 1968;12:445-6.

Williams JD, Moosdeen F, Teoh-Chan CH, Lim VK y Jayanetra P. Surveillance of antibiotic resistance in South East Asia. *Eur J Epidemiol*;1989;207-13.

Williams RD, Rollins LD, Pocurull DW, Selwyn M y Mercer HD. Effects of feeding chlortetracycline on the reservoir of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected swine. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14(5):710-9.

Willocks LJ, Morgan D, Sufi F, Ward LR y Patrick HE. *Salmonella virchow* PT 26 infection in England and Wales: a case control study investigating an increase in cases during 1994. *Epidemiol Infect* 1996;117(1):35-41.

Wilson IG, Wilson TS y Weatherup STC. *Salmonella* in retail poultry in Northern Ireland. *Commun Dis Rep* 1996;6(4):64-6.

Wilson JC. *A treatise on the continued fevers*. New York: Wood Publishing, 1888.

Wood RC, Hedberg DC y White K, editores. A multi-state outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes (Abstract). CDC. Epidemic Intelligence Service 40th Annual Conference. Atlanta, GA:US Department of Health and Human Services. Public Health Service. 1991:69

Woodward TE, Smadel JE, Ley HL et al. Preliminary report on the beneficial effect of chloromycetin in the treatment of typhoid fever. *Ann Intern Med* 1948;29:131-4.

Wray C, Beedell YE y McLaren M. A survey of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in England and Wales during 1984-1987. *Br Vet J* 1991;147(4):356-69.

Wray C, McLaren IM y Beedell YE. Bacterial resistance monitoring of *Salmonellas* isolated from animals, national experience of surveillance schemes in the United Kingdom. *Vet microbiol* 1993;35:313-9.

Wuthe H y Brandecker H. typing of *Salmonella enteritidis* (Gaertner's bacterium) by means of fermentation and colicinogeninly. *Zbl Bakt Hyg* 1983;177B:359-64.

Yang R. Experimental Salmonella enteritidis phage type 4 infection and egg transmission in Japanese quails. N Z Vet J 1992;40:117-9.

Zapatero E. Microbiología médica. Séptima edición. Valladolid: Sever cuesta, 1974:257-66.

Zinder ND y Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella. J Appl bacteriol 1952;64:679-99.