



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

DETECCIÓN DE *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y
Campylobacter coli EN AVES DE ENGORDA CON EXPOSICIÓN
NATURAL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ADRIANA DEL CARMEN GUTIÉRREZ CASTILLO

TUTOR: LEOPOLDO HENRI PAASCH MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL: NORMA LETICIA CALDERÓN APODACA
YOLANDA LÓPEZ VIDAL

MÉXICO, D. F.

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del PhD Leopoldo Henri Paasch Martínez en el Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

El comité tutorial estuvo integrado por:

PhD Leopoldo Henri Paasch Martínez	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina

La investigación se realizó con financiamiento del Departamento de Aves y el Departamento de Posgrado de la FMVZ UNAM, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM y beca crédito del CONACyT número de registro 62121.

DEDICATORIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México por el apoyo institucional brindado para la realización de los estudios de doctorado.

A mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina.

Al Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Campilobacteriosis y salmonelosis en el mundo	3
Salmonelosis	6
Campylobacteriosis	16
Métodos de diagnóstico	19
MATERIAL Y METODOS	23
Aves comerciales para el aislamiento primario	23
Aislamiento de <i>Salmonella</i>	23
Aislamiento de <i>Campylobacter</i>	24
Animales de estudio	24
Preparación de inóculos	25

Modelo de infección	26
Necropsia y toma de muestras	26
Técnica de PCR	27
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	31
Aislamiento de <i>Salmonella</i> en granja	31
Aislamiento de <i>Campylobacter</i> en granja	31
Aislamientos de los órganos de las aves	
SPF inoculadas experimentalmente	32
Histopatología de las aves SPF inoculadas	
Experimentalmente	32
Prueba de PCR	33
La tasa de positividad de las pruebas realizadas	34
DISCUSION	49
CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	56
ANEXOS	70

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Frecuencia de aislamientos de <i>Salmonella</i> en aves con exposición natural.	35
Cuadro 2. Frecuencia de aislamientos de <i>Campylobacter</i> en aves con exposición natural.	36
Cuadro 3. Recuperación de <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter</i> de diferentes órganos y heces de aves SPF inoculadas con los aislamientos obtenidos de aves con exposición natural.	37
Cuadro 4. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con <i>S.enteritidis</i> .	38
Cuadro 5. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con <i>S.typhimurium</i> .	39
Cuadro 6. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con <i>C.jejuni</i> .	40
Cuadro 7. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con <i>C.coli</i> .	41

Cuadro 8. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>S.enteritidis</i> y <i>S.typhimurium</i> . Inv1F; Inv 1R.	42
Cuadro 9. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>C.jejuni</i> y <i>C.coli</i> . 16S.	43
Cuadro 10. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>C.jejuni</i> . VS/15, VS/16.	44
Cuadro 11. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>C.jejuni</i> y <i>C.coli</i> . CSF/CSR.	45
Cuadro 12. Distribución de muestras positivas a las diferentes pruebas para detectar <i>S.enteritidis</i> .	46
Cuadro 13. Distribución de muestras positivas a las diferentes pruebas para detectar <i>C.jejuni</i> .	47
Cuadro 14. Distribución de muestras positivas a las diferentes pruebas para detectar <i>C.coli</i> .	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cultivo bacteriano de <i>Salmonella enteritidis</i> en agar Mac Conkey y Agar XLD.	70
Figura 2. Cultivo bacteriano de <i>Campylobacter jejuni</i> en agar MCC.	71
Figura 3. Cultivo bacteriano de <i>Campylobacter coli</i> en agar sangre de carnero.	71
Figura 4. Hígado. Normal. 10X. Tinción Hematoxilina Eosina.	72
Figura 5. Hígado. Ave inoculada con <i>Salmonella enteritidis</i> .	72
Figura 6. Hígado. Ave inoculada con <i>Salmonella typhimurium</i> .	72
Figura 7. Ciego. Normal. 10X. Tinción Hematoxilina Eosina.	73
Figura 8. Ciego. Ave inoculada con <i>Salmonella enteritidis</i> .	73
Figura 9. Ciego. Ave inoculada con <i>Salmonella typhimurium</i> .	73
Figura 10. Ciego. Normal. 10X. Tinción Hematoxilina Eosina.	74

Figura 11. Ciego. Ave inoculada con <i>Campylobacter jejuni</i> .	74
Figura 12. Ciego. Ave inoculada con <i>Campylobacter coli</i> .	74
Figura 13. Prueba de PCR en cepas de <i>Salmonella enteritidis</i> aisladas en granja.	75
Figura 14. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>S.enteritidis</i> .	76
Figura 15. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>S.tyhphimurium</i> .	77
Figura 16. Prueba de PCR en cepas de <i>Campylobacter sp.</i> aisladas en granja.	78
Figura 17. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>Campylobacter jejuni</i> . 16S.	79
Figura 18. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>Campylobacter coli</i> . 16S.	80
Figura 19. Prueba de PCR en cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> aisladas en granja.	81
Figura 20. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con <i>Campylobacter jejuni</i> . VS/15, VS/16.	82
Figura 21. Prueba de PCR en cepas de <i>Campylobacter coli</i> aisladas en granja.	83

Figura 22. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter coli*. CSF/CSR.

84

RESUMEN

La campilobacteriosis y la salmonelosis son las enfermedades infecciosas más comunes en el mundo, sin embargo en México, no se ha generado suficiente información sobre el papel de las aves comerciales como reservorios de estos agentes que pueden ser transmitidos a los humanos mediante el consumo de alimentos. En el presente trabajo se detectaron *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en una parvada de pollo de engorda convencional. Las muestras se obtuvieron mediante hisopos de la cloaca de 30 aves comerciales en una granja convencional. Con los aislamientos obtenidos, se inocularon aves libres de patógenos específicos para determinar si dichos inóculos eran capaces de producir infección. Las técnicas empleadas fueron el aislamiento bacteriológico, histopatología y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se lograron los aislamientos de 10 cepas de *Salmonella sp*, que fueron serotipificadas como *Salmonella enteritidis* (8) y *Salmonella typhimurium* (2) y ratificadas por PCR. Se aislaron 11 cepas de *Campylobacter sp* que fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas como *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, asimismo confirmadas por PCR. Nuestros hallazgos sugieren que la prevalencia en México de *Salmonella sp* en granjas avícolas es semejante a la de los demás países que tienen avicultura tecnificada, además, en México los serotipos más frecuentemente aislados en humanos son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, que corresponden a los aislamientos realizados en este estudio en aves aparentemente sanas. Dado que en nuestro estudio los aislamientos de *Campylobacter* fueron posibles desde el primer muestreo resultando positivas 11 de 30 aves aparentemente sanas y que las pruebas de PCR detectaron heces positivas en todas las aves inoculadas experimentalmente, resulta pertinente suponer que en México deben ser frecuentes las infecciones por *Campylobacter en humanos* derivadas del consumo de alimentos de origen aviar, lo que deberá confirmarse en futuros estudios epidemiológicos. El método de PCR empleado en el presente estudio, dada su sensibilidad y especificidad, sugiere ser el indicado para la detección de *Salmonella* y *Campylobacter* en los animales y en los alimentos de origen animal con el objeto de sentar las bases para un indicador epidemiológico confiable en México.

Palabras clave: *S. enteritidis*, *C. jejuni*, *C. coli*, aves.

ABSTRACT

World Wide, the most common infections in humans and animals are those produced by *Salmonella sp* and *Campylobacter sp*, however, more information is needed in Mexico regarding the role of poultry as reservoir of these agents that can be transmitted to humans by the food chain. In the present study *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, and *Campylobacter coli* were detected in a flock of commercial broilers naturally exposed. Samples were collected by vent swabs of 30 birds from the same flock. With the isolates, specific pathogen free birds were inoculated in order to determine if those isolates were capable of producing infection. Tests performed included bacterial isolation, histopathology, and PCR. Ten strains of *Salmonella sp* were isolated, eight belonging to *S.enteritidis* and two to *S.typhimurium*, all confirmed by PCR. Eleven strains of *Campylobacter sp* were isolated and identified by biochemistry as *C.jejuni* and *C.coli* and also confirmed by PCR. Our findings suggest that the prevalence of *Salmonella sp*, in poultry farms in Mexico is similar than in other countries with industrial poultry production and besides the serological types most frequently isolated in humans in Mexico are *S.enteritidis* and *S.typhimurium*, which correspond to the isolations obtained in the present study from apparently healthy birds. Considering that in our study, *Campylobacter* isolations were possible from the first sampling on and that 11 from 30 apparently healthy birds were positive and also that fecal samples of all inoculated birds were positive to the PCR test, it is pertinent to arrive at the conclusion, that in Mexico, human infections with *Campylobacter* of avian origin might be frequent, issue that must be confirmed in future epidemiological studies. The PCR methods used in the present study, due to the sensitivity and specificity demonstrated in these assays, point to be recommendable for detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in animals and food of animal origin, aiming to establish solid epidemiological indicators in Mexico.

Key words: *S.enteritidis*, *C.jejuni*, *C.coli*, aves.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones debidas a la ingestión de alimento contaminado constituyen un problema de salud pública que ha cobrado mayor importancia en muchos países durante la última década. Las enfermedades gastrointestinales en humanos ocasionadas por *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, se deben principalmente al consumo de alimentos contaminados, entre los cuales destacan la carne de pollo, la carne de cerdo, el huevo, el agua y la leche sin pasteurizar. Debe tomarse en cuenta además, el posible contagio por la convivencia con animales de compañía que en la mayoría de los casos actúan como portadores sanos. Para prevenir y controlar la contaminación de los alimentos con *Salmonella sp* y *Campylobacter sp*, se requiere desarrollar pruebas de detección rápidas, altamente sensibles, específicas y económicas. En México existen antecedentes de aislamientos de *Salmonella sp* móviles en parvadas naturalmente expuestas, sin embargo se desconoce la situación de la campilobacteriosis (Padrón, 1990, Gutiérrez, 1993, Gutiérrez *et al*, 1995). Los resultados de los aislamientos bacteriológicos de aves comerciales permitirán conocer la presencia de *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* que son agentes poco estudiados en México. Asimismo la inoculación de aves con los aislamientos obtenidos es importante para conocer el comportamiento de estos agentes infecciosos en el organismo de las aves.

En la avicultura moderna existen infecciones persistentes, tales como la salmonelosis y la campilobacteriosis que se determinan por una variedad de factores relacionados como la edad y el estado inmunológico de las aves, así

como la virulencia de los agentes involucrados. En la mayoría de infecciones naturales, se asocian varios agentes infecciosos y también coinciden factores de predisposición como el manejo, la nutrición y el ambiente, de ahí la necesidad de realizar estudios con inoculaciones experimentales para ponderar la importancia de los agentes aislados en casos de campo (Goryo *et al*, 1987).

El aparato digestivo de las aves es un tubo forrado por células epiteliales especializadas, revestimiento que es continuo con el que cubre la piel, por ello, se considera expuesto al ambiente externo, del que provienen los patógenos presentes en los alimentos. A lo largo del trayecto del tubo digestivo, las células se diferencian en una variedad de epitelios especializados que forman una barrera selectiva que permite el paso de fluidos, y nutrientes disueltos pero que, en condiciones normales, evita la entrada de organismos patógenos a la circulación sanguínea (Riddell, 1996).

La crianza comercial de aves nunca estará libre de infecciones, no obstante los adelantos en bioseguridad. Las aves comerciales están expuestas a múltiples agentes patógenos no obstante haber sido criadas bajo buenas prácticas de manejo y nutrición (Hoerr, 2003). Existe una frecuencia elevada de infección natural en las granjas avícolas con *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Las metas de este trabajo fueron detectar la presencia de *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* y determinar la frecuencia de aislamiento de estos agentes en una parvada de pollo de engorda naturalmente expuesta. También se decidió evaluar la diseminación de la infección mediante estudios anatomopatológicos, microbiológicos y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del bazo, hígado, intestino delgado y ciegos de aves infectadas experimentalmente con las cepas de campo de *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* obtenidas de la parvada de aves naturalmente expuesta.

REVISIÓN DE LITERATURA

Campylobacteriosis y salmonelosis en el mundo

Los alimentos de origen animal pueden ser la fuente de un importante número de infecciones en humanos, sin embargo, aunque el riesgo es bien conocido, aún no ha sido debidamente cuantificado (Hinton, 2000). En la actualidad la salmonelosis y la campilobacteriosis son las dos zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Noruega, Dinamarca y países Bajos en los que se han presentado brotes comprobados de salmonelosis transmitida por alimentos. Se ha calculado que en EUA, la salmonelosis causa más de 18 000 hospitalizaciones y 500 defunciones anuales (OMS, 1988). El costo de la Salmonelosis humana en Estados Unidos asciende a 3 millones de dólares anuales y en Dinamarca dicho costo es de 15.5 millones de dólares. En este último país se ha implementado un programa de control de salmonelosis en la producción de animales destinados al consumo con un costo anual de 14.1 millones de dólares que sin embargo reconsidera redituable habida cuenta que se ha calculado que este programa reduce en 25.5 millones de dólares las pérdidas ocasionadas por ausencias laborales y tratamientos médicos (INFOSAN, 2005). Los datos relacionados con el costo de las enfermedades transmitidas por los alimentos, por lo general no son publicados en los países en desarrollo.

En años recientes los problemas relacionados con *Salmonella* han aumentado significativamente en cuanto a la incidencia y la gravedad de los casos en humanos. Varios países han sufrido un aumento de 20 veces en los años

noventa comparado con los años ochenta. Aunque algunos países han logrado limitar y aun revertir estos aumentos, la propagación de los serotipos *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* va en aumento (Unión Europea, 2004, 2006).

Kapperud G, Stenwig H, y Lassen J., (1998), realizaron en Noruega un análisis retrospectivo de casos de salmonelosis de 1966 a 1996 y sus resultados sugieren que existe relación epidemiológica entre las aves y los humanos, además de otros factores que incrementan el riesgo de infección tales como el agua de bebida no tratada, el contacto directo con aves silvestres o sus deyecciones y la ingestión accidental de arena o tierra.

En el Reino Unido la Oficina de censos de población y encuestas (OPCS), en su informe de casos de intoxicación alimenticia indica que la campilobacteriosis se incrementa entre junio y agosto al igual que la salmonelosis (Ministry of Agriculture, 1988). Este incremento en la multiplicación de patógenos en los alimentos que no son almacenados a temperaturas de refrigeración se presenta cuando la temperatura ambiental se eleva y también por la tradición durante el verano de consumir barbacoas en las que la carne no se cuece adecuadamente (FAHO/WHO, 1998).

En Suiza se han realizado estudios de RNA en aislamientos de *Salmonella enteritidis* de origen humano y aviar que comparten el ribotipo A el cual fue responsable de dos brotes de infección en humanos. Durante la última década el número de casos reportados en Suiza se ha duplicado de 3000 a 6000, debidos principalmente a un aumento en el número de infecciones por *Salmonella enteritidis* (Wierup M. et al, 1995).

La epidemiología de la salmonelosis en Suiza durante 2001, estuvo determinada en un 60 % por cuatro serotipos correspondientes a *Salmonella typhimurium* con 22.1%, *Salmonella enteritidis* con 17.7%, *Salmonella newport* con 10% y *Salmonella heidelberg* con 5.9%. Esta tendencia es aún más

pronunciada en Francia donde el 71% de los casos en humanos fueron ocasionados por tres serotipos correspondientes a *Salmonella enteritidis* con 33%, *Salmonella typhimurium* con 32% y *Salmonella hadar* con 6% (Velge et al, 2005).

En México se analizaron los serotipos de 24 394 aislamientos de *Salmonella* realizados en los laboratorios de salud pública y privados de todo el país, así como en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Se identificaron 199 serotipos, siendo el más frecuente en muestras de casos clínicos *Salmonella typhimurium* con 20.4% seguida de *Salmonella enteritidis* con 18.3%, sin embargo, al analizar progresivamente los resultados desde 1991, se aprecia el incremento gradual de *Salmonella enteritidis* respecto a *Salmonella typhimurium*. Si se combinan los aislamientos de casos humanos y animales, los serotipos mas frecuentes en México son en orden descendiente *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella agona* y *Salmonella anatum*. Desde el punto de vista epidemiológico resulta importante conocer cuáles son los serotipos prevaletentes y los de nueva aparición para poder determinar las acciones de prevención requeridas (Gutiérrez-Gogco et al, 2000).

La salmonelosis en México, en su presentación como fiebre tifoidea se incrementó de 205 casos en 1991 a 307 en 1993, representando el 11.2% y el 16.2% respectivamente del total de enfermedades registradas por la Secretaría de Salud. En nuestro país, la fiebre tifoidea se considera aún como una de las principales enfermedades diarreicas que entre 1994 y 1997 ocasionó 28 defunciones anuales en promedio (Secretaría de Salud, 2000).

En los países en desarrollo, la diarrea producida por *Campylobacter sp*, generalmente ocurre solo en niños menores de dos años de edad, en el resto de la población, la infección es aparentemente asintomática. La razón de esta diferencia no está clara, pero puede reflejar mayor inmunidad adquirida por los habitantes de países con deficientes condiciones de higiene (Wassenaar y

Newel, 2002). *Campylobacter jejuni* es la causa más frecuente de diarreas infecciosas agudas en los países desarrollados, supera a las infecciones causadas por *Salmonella* y *Shigella* (Lamoureux *et al*, 1997). La infección en humanos se limita al tracto alimentario y produce diversos tipos de diarrea. Raras veces la infección puede ocasionar trastornos neurológicos (Barrow y Page, 2000).

La mayoría de los casos se producen por la ingestión de carne y leche. Además *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* también producen gastroenteritis en humanos, sin embargo, *Campylobacter lari*, cuyo origen es porcino, representa solo el 3% de los aislamientos (Lamoureux *et al*, 1997).

En Inglaterra y Gales las aves son uno de los alimentos que con mayor frecuencia se reportan asociados a brotes de *Campylobacter* (Pearson y Healing, 1996).

Un estudio efectuado en Dinamarca reportó que el consumo de carne de cerdo y bovino en barbacoa, de pollo insuficientemente cocinado y de agua contaminada, son factores de riesgo importantes para contraer la infección (Neimann *et al*, 1998).

Quizá el factor más importante en la cadena epidemiológica sean las personas que preparan y sirven los alimentos debido a la contaminación cruzada entre aves y humanos, el cocimiento inadecuado de la carne, el lento enfriamiento, la falta de refrigeración y el insuficiente recalentamiento (OMS, 1988; Yang *et al*, 2002).

Salmonelosis

La salmonelosis es una de las enfermedades más comunes transmitidas por los alimentos, constituye un problema de salud pública y representa un alto

costo de salud en muchos países. Millones de casos se notifican en todo el mundo cada año dando lugar a miles de muertes.

La salmonelosis es una zoonosis de importancia económica en todo el mundo en humanos y animales y se puede manifestar de muy diversas maneras que van desde infecciones inaparentes o portadores recuperados hasta enteritis, septicemia y aborto solos o combinados. Las salmonelas rápidamente se transmiten entre animales, de animales a humanos y entre humanos de forma directa o indirecta (Nakamura *et al*, 1994). El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y presenta la peculiaridad de no fermentar o fermentar lentamente la lactosa (Clarke y Gyles, 1986).

Las salmonelas son responsables de infecciones intestinales limitadas o extensas en humanos y animales. En años recientes la incidencia de *Salmonella enteritidis* se ha incrementado casi a niveles de pandemia atribuida a las infecciones transováricas en las aves de abasto, aunada a la alta virulencia de las cepas de *Salmonella enteritidis* que aún a dosis bajas pueden producir enfermedad grave en humanos. Existen además factores de complicación que incluyen la producción y procesamiento industrial de alimentos, la transferencia de plásmidos entre organismos bacterianos, la resistencia a los antibióticos, la existencia de portadores humanos asintomáticos y los reservorios animales entre los que destacan aves, cerdos y bovinos (Doran *et al*, 1996; Zhao *et al*, 2001).

Durante mucho tiempo se creyó que era necesario ingerir salmonelas en cantidades de 1×10^5 o más por gramo de alimentos para que se produjera la enfermedad, pero actualmente se ha demostrado que una concentración de 3 a 10 células por gramo puede causar enfermedad (Hinton, 2000) y dado que contaminan agua, frutas, verduras, huevo fresco, carnes, mariscos, leche y alimentos procesados, el problema de salud pública que representan es formidable. Además debe tomarse en cuenta la capacidad de estos organismos

para sobrevivir en materia fecal, tierra, pasturas, telas, polvo y hasta plásticos (OMS, 1988).

En comparación con otras bacterias Gram negativas, las salmonelas son relativamente resistentes a varios factores ambientales. Crecen a temperaturas que oscilan entre 8 y 45°C y un pH de 4 a 8. También pueden multiplicarse en un medio con poca concentración de oxígeno o totalmente carente de este (OMS, 1997).

La gran resistencia que tienen estos microorganismos no sólo al secado, a la congelación y a la salazón, sino también al ahumado explica por qué sobreviven en muchas clases de alimentos (OMS, 1988). Se ha demostrado que las salmonelas son resistentes a la deshidratación aún por años, sobre todo en las heces, el polvo y los materiales secos como algunos alimentos para consumo humano y animal. Se ha comprobado que estas bacterias pueden sobrevivir por varios meses en salmuera en concentraciones de más de 20% de sal, sobre todo en productos con un elevado contenido de proteína o grasa. En carne seca ahumada puede sobrevivir por varias semanas o aun meses. Las salmonelas son sensibles a la irradiación beta y gama y a temperaturas superiores a 70° C.

El género *Salmonella* es representativo de la familia Enterobacteriaceae en la que predominan los bacilos Gram negativos que no forman esporas y que en el género *Salmonella* presentan tres tipos de antígenos. Las propiedades de aglutinación de los antígenos somático O, flagelar H y capsular Vi, se emplean para diferenciar a los más de 2500 serotipos de *Salmonella*. Cada año se aumentan nuevos serotipos a la lista de Kauffmann-White (Popoff *et al*, 2003).

El género *Salmonella* consta de solo dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se divide a su vez en seis subespecies: *entericae*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. En el serotipo *Salmonella enterica* subespecie I, es decir *Salmonella enterica*, subespecie

entericae, los grupos antigénicos O más comunes son A, B, C1, C2, D y E. Las cepas de estos grupos causan aproximadamente el 99% de las infecciones por el género *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente. Los serotipos de las otras subespecies generalmente infectan animales de sangre fría pero muy rara vez a humanos (Uzzau *et al*, 2000).

La nomenclatura del género *Salmonella* es compleja y se usan diferentes sistemas de clasificación. La nomenclatura más usada se basa en los nombres de los serotipos de la subespecie I, por ejemplo *Salmonella enterica*, subespecie *entericae*, serotipo *enteritidis* se abrevia como *Salmonella enteritidis*. Los serotipos pueden a su vez subdividirse usando biotipificación y fagotipificación. Un biotipo es la variación bioquímica entre dos microbios del mismo serotipo, mientras que el fagotipo refleja las diferencias entre dos organismos con el mismo serotipo pero diferente susceptibilidad a la lisis por bacteriófagos (Ward *et al*, 1987).

El grado de adaptación varía entre los diferentes serotipos e influye sobre la patogenicidad para el hombre y los animales. Los serotipos adaptados al hombre tales como *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* generalmente causan enfermedades severas en humanos como el síndrome septicémico y la fiebre tifoidea, pero no son patógenos para los animales. Los serotipos adaptados a los animales como *Salmonella gallinarum* de las aves y *Salmonella abortus-ovis* de las ovejas solo infectan esporádicamente a los humanos y producen signos clínicos moderados. Sin embargo *Salmonella choleraesuis*, cuyo principal hospedador es el cerdo, también causa enfermedad sistémica severa en humanos. *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* son serotipos que afectan tanto humanos como animales y generalmente causan infecciones menos severas que la fiebre tifoidea en humanos, pero pueden llegar a producir una infección parecida a la fiebre tifoidea tanto en humanos como en ratones, sin embargo la infección en pollos es asintomática (Duchet *et al*, 1997, Uzzau *et al*, 2000).

En la segunda mitad del siglo XX ocurrieron dos cambios principales en la epidemiología de *la salmonelosis* en el mundo, por un lado, el surgimiento de infecciones en humanos provocadas por el consumo de alimentos contaminados con *Salmonella enteritidis* y por otro, la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *Salmonella typhimurium* (Velge *et al*, 2005).

Las investigaciones hechas en brotes de salmonelosis o casos esporádicos indican que la fuente más común de *Salmonella enteritidis* es la carne insuficientemente cocida, principalmente de pollo y los huevos crudos (Coyle *et al*, 1988, Délaroque *et al*, 1998). La contaminación de los huevos por salmonela se atribuye al daño del cascarón o a su contaminación después de la postura. En el caso específico de *Salmonella enteritidis*, los huevos pueden contaminarse con heces o infectarse en el ovario al momento de la ovulación (Humphrey, 1994).

Los factores responsables de la epidemia por *Salmonella enteritidis* no han sido totalmente dilucidados, siendo una limitante la detección de la infección en pollos aparentemente sanos. Se sabe que *Salmonella enteritidis* causa infecciones intestinales sin signos clínicos en una amplia gama de especies, especialmente las aves. Los brotes agudos de la enfermedad con alta mortalidad no ocurren en aves (Duchet *et al*, 1997). Sin embargo los portadores aparentemente sanos pueden diseminar la infección en la parvada mediante la contaminación del ambiente con sus deyecciones. En el huevo también es difícil detectar *Salmonella enteritidis* cuando el número de bacterias presentes es menor a 9 por pieza (Humphrey, 1994).

La modernización de las granjas de pollos y las exportaciones de aves progenitoras han jugado un rol importante en la diseminación de *S. enteritidis*. Por ejemplo, la principal estrategia de muda forzada en las gallinas de postura en Estados Unidos es retirar el alimento a las aves hasta que pierdan peso, sin embargo esto las hace mas susceptibles a la infección por *Salmonella*

enteritidis y una vez infectadas excretan el microorganismo en concentraciones significativamente altas (Holt, 2003).

Los factores de manejo asociados a mayor riesgo de infección por *Salmonella enteritidis* son el tamaño de la parvada, el tipo de instalaciones y la coexistencia en la misma granja de aves de diferente edad (Mollenhorst *et al*, 2005).

Investigaciones realizadas en los Países Bajos, indican que las parvadas de gallinas ponedoras se infectan principalmente por contacto directo con el ambiente contaminado de la granja, mientras que el contagio de progenitora a su descendencia es menor (Van de Giessen *et al*, 1994). En contraste, Ward y colaboradores, sugieren que la epidemia ocurrida en el Reino Unido a principios de los años 80 se debió a la introducción de líneas progenitoras infectadas con el fago tipo 4 (Ward *et al*, 2000).

Varios autores han sugerido que *Salmonella enteritidis* puede ser introducida en las parvadas por roedores, los cuales son muy susceptibles, al grado que se llegó a usar la infección intencional para destruir ratones (Henzler y Opitz, 1992, Friedman *et al*, 1996). *Salmonella enteritidis* se empleó en Estados Unidos para combatir roedores durante el brote de *Yersinia pestis* en San Francisco en 1895 y fue usada ocasionalmente como rodenticida en Europa hasta 1960. Existe una correlación entre la presencia de *Salmonella enteritidis* en ratones y la infección en aves. Además informes recientes sugieren que varias especies de roedores están involucrados en el mantenimiento de la infección por *Salmonella enteritidis* en las granjas avícolas (Garber *et al*, 2003).

El uso del sistema de fago tipificación ha mostrado que la mayoría de los casos de *Salmonella enteritidis* en Europa fueron causados por el fago tipo 8 antes de 1980 y el fago tipo 4 después. En contraste *Salmonella enteritidis* usada en el Reino Unido como pesticida en 1940 fue fago tipo 6 y los aislamientos de roedores en 1993 pertenecen al fago tipo 23 (Friedman *et al*, 1996, Guard *et al*,

1997). Sin embargo Threlfall y colaboradores puntualizan el hecho de que la adquisición del plásmido IncX convierte las cepas fago tipo 4 en el fago tipo 6 (Threlfall *et al*, 1996).

El dramático incremento de infección por *Salmonella enteritidis*, fago tipo 4, en Europa del este desde 1980, sugiere que la bacteria ha adquirido recientemente nuevos genes de virulencia (Helmuth y Schroeter, 1994). Algunos trabajos han demostrado que los pases repetidos a través del tracto reproductivo de las aves, incrementa la capacidad de *Salmonella enteritidis*, fago tipo 13a, para infectar los huevos, mientras que los pases en hígado y bazo disminuyen dicha capacidad (Gast, 2003).

Salmonella gallinarum es capaz de generar inmunidad en las parvadas contra el serotipo 09 al que pertenece *Salmonella enteritidis*, por ello la erradicación de *Salmonella gallinarum* y la consecuente suspensión de la vacunación rutinaria, pueden abrir un camino para el establecimiento de *Salmonella enteritidis* (Velge *et al*, 2005, Chacana *et al*, 2006). Datos recientes muestran que ha ocurrido una disminución sustancial en el número de casos por *Salmonella enteritidis* en humanos desde 1997 en el Reino Unido (Cogan y Humphrey, 2003, Bouvet y Grimont, 2001). En este caso, el descenso del 50% en la infección, corresponde a la introducción de nuevas vacunas vivas en sustitución de las vacunas con bacterias muertas en formalina (Ward *et al*, 2000). Sin embargo, la infección por *Salmonella enteritidis* disminuyó también en varios países en los que no fueron vacunadas las aves, (Barza, 2002), lo que puede atribuirse al establecimiento de medidas de higiene, a la capacitación de las personas que preparan alimentos y a la mayor conciencia sanitaria de los consumidores (Van Pelt *et al*, 2003).

Por otro lado en España, la infección por *Salmonella enteritidis*, se ha incrementado y desde 2001 se han reportado casos del fago tipo 14b en turistas (Nygard *et al* 2004).

Algunas serovariedades de *Salmonella sp* han sido evaluadas en adhesión, invasión y virulencia en modelos aviares. Se ha demostrado experimentalmente que utilizando una cepa diferenciada por marcadores de resistencia a antibióticos, se previene el establecimiento subsiguiente de la misma cepa de campo lo que promete ser de utilidad para el ulterior desarrollo de vacunas administradas por vía oral (Martin *et al*, 1996).

En años recientes, mayor número de genomas microbianos han sido secuenciados y comparados, lo que ha permitido estimar la frecuencia de mutaciones. Una importante fuente de evolución son los mecanismos de recombinación que se requieren en el proceso de replicación en los que la variabilidad del genoma puede resultar de la adquisición o pérdida de regiones que portan genes. También puede ocurrir la transmisión horizontal de fragmentos de ADN mediante plásmidos, islas genómicas, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción. Estos elementos móviles pueden generar la capacidad en los microorganismos para infectar determinadas células (Ochman *et al*, 2000).

Los genes asociados a virulencia, también llamados islas de patogenicidad, se originan fuera de las bacterias y en el caso particular de las salmonelas, reciben el nombre de Islas de patogenicidad de *Salmonella sp* (SPI). Estas regiones de cromosomas, contienen grupos de genes que incrementan la virulencia del microorganismo y pueden transformar un organismo no patógeno en uno virulento. Hasta ahora se han descrito 12 islas de patogenicidad de *Salmonella sp*, algunas de ellas son compartidas por todos los serotipos del género pero algunas son específicas de algunos serotipos (Velge *et al*, 2005). Otra importante fuente de diversidad son los integrones que generalmente llevan uno o mas genes de resistencia a los antibióticos (Boyd *et al*, 2001).

Un inevitable efecto del uso de antibióticos es el surgimiento y diseminación de bacterias resistentes. Existen cepas de *Salmonella sp* resistentes a penicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas e incluso a las

fluoroquinolonas, ésta última resistencia atribuida a mutaciones del gen *gyrA* (Angulo *et al*, 2000).

Teniendo en cuenta que los genes de resistencia a los antibióticos pueden propagarse por integrones, transposones, islas genómicas y plásmidos, el tratamiento con agentes antimicrobianos, lleva al aumento de la población de bacterias resistentes a todos los antibióticos relacionados entre si y por ello el uso de antibióticos en el alimento de los animales puede tener efectos adversos para la salud humana (Velge *et al*, 2005).

Los programas de prevención y control de la salmonelosis deben ser integrales. La vacunación, la exclusión competitiva y la selección genética de animales resistentes son métodos importantes para reducir la infección por *Salmonella enteritidis* (Beaumont *et al*, 1999). Sin embargo, siempre deberá ponderarse que cualquier intervención biológica puede resultar en una nueva característica evolutiva y así la bacteria adaptada a un nuevo nicho ecológico desplaza de este a la bacteria previamente residente.

La infección por *Salmonella enteritidis* en las aves, ocurre inicialmente como colonización gastrointestinal, posteriormente los microorganismos se multiplican en los macrófagos móviles y fijos para finalmente producir bacteremia e infección en diversos órganos (Asheg *et al*, 2003). Los principales signos clínicos son depresión y diarrea. Se pueden llegar a observar lesiones a la necropsia como distensión por gas del intestino delgado y dilatación de ciegos (Berchieri *et al*, 2001).

La mortalidad y los signos clínicos disminuyen a medida que incrementa la edad de las aves. En aves adultas puede detectarse ocasionalmente diarrea ligera y deshidratación pero en general no se presentan signos de enfermedad. En gallinas en producción puede disminuir la postura y los huevos suelen estar infectados (Hopper y Mawer, 1988, Henzler *et al*, 1994). La ausencia de signos en aves adultas es justamente el factor de riesgo silencioso de salud pública

por el estado de portadores sanos que conservan las aves durante su vida productiva (Shivaprasad *et al*, 1990).

La inoculación experimental de las aves con *Salmonella enteritidis* por vía oral, llega a producir daño epitelial e infiltración con heterófilos de la lámina propia de los ciegos. Las células epiteliales de todo el intestino contienen bacterias, pero los ciegos y la unión íleo-cecal son los sitios de mayor afinidad. Además la invasión epitelial permite que la bacteria atraviese la membrana basal hacia la lámina propia, e infecte a los macrófagos (Asheg, 2003; Holt y Porter, 1992; Porter y Holt, 1993).

En parvadas infectadas naturalmente con *Salmonella enteritidis*, se ha llegado a detectar una ligera reacción inflamatoria en los ovarios y oviductos (Hoop y Pospischil, 1993).

Salmonella enteritidis inicia la infección adhiriéndose a la superficie de la mucosa intestinal y posteriormente invade las células epiteliales. Su adherencia a la superficie del epitelio depende de las fimbrias y el flagelo. Las principales fimbrias son SEF14, SEF17 Y SEF21. Algunos investigadores han encontrado que el glicosfingolípido (GSL) GlcCer (N-1) y el gangliósido GM3 (G-1) de la mucosa intestinal de los pollos que se han identificado en duodeno, intestino delgado, ciego y recto, son los receptores de la fimbria SEF21 de *Salmonella enteritidis*. Cuando las bacterias invaden el epitelio y llegan a la lámina propia infectan a los macrófagos principalmente pero también a los linfocitos T y B. En ocasiones *Salmonella enteritidis* es resistente a la acción de los macrófagos y entonces estas células le sirven de vehículo para invadir tejidos en otros órganos y sistemas (Kramer *et al*, 2003).

La salmonelosis aviar sigue siendo una barrera sanitaria para la exportación de carne de pollo y huevo de México a EUA como lo demuestra el acuerdo del Departamento de Agricultura de EUA que el de 14 de abril de 1999 aprobó la certificación favorable de Francia, Canadá, Hong-Kong, Israel, Holanda y Reino

Unido, mientras que la certificación de México quedó pendiente (Agriculture Department of the U.S.A., 1999).

Campylobacteriosis

La infección por *Campylobacter* ocasiona una de las enfermedades entéricas bacterianas más comunes en los países desarrollados. Las fuentes de ésta infección se relacionan generalmente con alimentos de origen animal, principalmente productos avícolas, agua, leche cruda y mascotas (Neil *et al*, 1984; Nielsen y Nielsen, 1999).

El género *Campylobacter* comprende 16 especies de bastones espirales curvados Gram negativos con flagelos que les dan movilidad. Los organismos del género *Campylobacter* son microaerófilos. *Campylobacter jejuni* subespecie *jejuni*, *Campylobacter jejuni* subespecie *doylei*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* y *Campylobacter helveticus* forman un grupo de especies genéticamente relacionadas (Petersen *et al*, 2001). *Campylobacter jejuni jejuni* es patógeno para humanos y *Campylobacter jejuni doylei* solo esporádicamente causa enfermedad en humanos. Las tres principales especies, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* causan enteritis (Phillips, 1995).

Bioquímicamente, los *Campylobacter* son oxidasa positivos, reducen nitratos, son negativos a rojo de metilo y Voges-Proskauer y no hidrolizan la gelatina. La mayoría de las especies son urea negativas, excepto algunas cepas de *Campylobacter lari*. La exposición prolongada al agua, hace que los microorganismos adquieran forma cocoide que en ocasiones no es cultivable (Federighi, 1999; Talibart *et al*, 2000).

Campylobacter jejuni jejuni, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* son termofílicos porque crecen bien a temperaturas entre 42-43°C y no a menos de 25° C. Los métodos de cultivo en medios selectivos requieren dos días y dos

días más de pruebas confirmatorias para especie, sin embargo, no permiten el aislamiento de todas las especies presentes. Debido a las múltiples dificultades técnicas, se han elaborado diversos métodos de detección como la aglutinación látex, que es capaz de identificar las formas espirales y cocoides a niveles de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro. Es importante diferenciar a los miembros del género *Campylobacter* clínicamente significativos de otros organismos que presentan similitudes morfológicas y ecológicas. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son los patógenos más frecuentemente aislados, sin embargo esto puede estar arrojando resultados inexactos debido al uso de antibióticos en los medios selectivos, los cuales no permiten el crecimiento de la mayoría de los otros miembros del género *Campylobacter*, por ello, cuando se usa la técnica de filtración sin antibióticos, la variedad de aislamientos se incrementa (Wassenaar y Newell, 2002).

La serotipificación de *Campylobacter* se realiza con el esquema de Penner basado en los antígenos "O" del LPS por medio de la técnica de hemoaglutinación indirecta y con el esquema de Lior, con base en los antígenos proteicos termolábiles de superficie por medio de la técnica de aglutinación en placa, ya que son complementarios (Lior *et al*, 1982, Penner, 1988).

Las técnicas que hoy en día se han descrito para identificar *Campylobacter* son métodos genéticos, la mayoría de ellos basados en PCR. Potencialmente PCR puede ser más fácil de realizar y más confiable que las pruebas bioquímicas, sin embargo la identificación por PCR no ha sido aceptada como método de rutina. Algunos métodos de detección por PCR detectan *Campylobacter* termofílicos directamente, muchos de estos métodos están basados en la amplificación de genes flagelares o genes ribosomales. En algunos de los métodos el gen empleado para especies específicas ha sido seleccionado por hibridación y no han sido caracterizados posteriormente. Los métodos difieren en complejidad, desde los que detectan directamente desde la muestra, los que usan pre-enriquecimiento y filtrado, amplificación, electroforesis en gel seguido

de Southern blotting (o spot blots) e hibridación. La relativa eficacia de estos métodos todavía tiene que ser determinada. En estudios comparativos PCR ha resultado ser al menos tan sensible como las clásicas técnicas bioquímicas (Phillips, 1995; Al Rashid *et al*, 2000).

La dosis infecciosa requerida para producir campilobacteriosis ha sido determinada en 10^4 UFC para humanos (Black *et al* 1992) y en 90 UFC en aves (Ruiz-Palacios *et al*, 1981). En aves, sin embargo, ocurren infecciones asintomáticas a dosis mas bajas y el desarrollo de la enfermedad depende del estado de inmunidad.

Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli* viven como comensales en el tracto intestinal de muchos animales incluyendo los de producción de alimentos y las mascotas. Estos organismos pueden sobrevivir en el ambiente a 4° C por varias semanas. El vehículo principal de transmisión a humanos es la carne cruda o insuficientemente cocida, principalmente la de pollo. Otras fuentes de infección en humanos incluyen agua, leche bronca, mariscos crudos y mascotas (Brooks *et al*, 1995).

Los síntomas de la campylobacteriosis en humanos incluyen debilidad y dolor abdominal. El tiempo de incubación es generalmente entre uno a siete días, con un promedio de 3 días y en la mayoría de los casos el paciente se recupera en una semana. Muchas cepas de *Campylobacter* producen enterotoxinas y citotoxinas, las cuales son probablemente la causa de los síntomas digestivos, sin embargo existen evidencias de que algunas cepas pueden producir hepatotoxinas y una citotoxina (Phillips, 1995).

Para las parvadas, se han identificado varios factores de riesgo que incluyen agua sin desinfectar y mantener en la misma granja aves y cerdos (Phillips, 1995). Hasta hace poco se pensaba que la principal fuente de transmisión de *Campylobacter sp* en las aves era horizontal a partir de basura, agua, insectos, equipo y fauna silvestre. No se concebía la transmisión de las gallinas

progenitoras a su descendencia a través del huevo con base en la imposibilidad de cultivar *Campylobacter sp* de las incubadoras o de los pollitos recién nacidos (Neil *et al*, 1984). Sin embargo en diversos estudios se sugiere la transmisión vertical como una forma de infección (Clark y Bueschkens, 1986), tomando en cuenta que *Campylobacter sp* se ha encontrado en todos los segmentos del tracto reproductivo de las gallinas y en el semen de gallos progenitores (Cox *et al*, 2005).

El principal cambio asociado con la infección por *Campylobacter jejuni* en pollos es la distensión con gas del intestino que se extiende desde el asa duodenal hasta la bifurcación de los ciegos. También se acumula moco y el contenido suele ser acuoso (Blaser *et al*, 1983). La intensidad de estos cambios depende de la citotoxicidad de la cepa de *Campylobacter sp* involucrada, habiendo infecciones en las que se llegan a presentar hemorragias (Welkos, 1984) como en la campilobacteriosis humana (Klipstein *et al*, 1985).

En pollitos recién nacidos que recibieron ciclofosfamida como inmunosupresor, se detectaron manchas amarillas en el parénquima hepático a las 24 horas posteriores a la inoculación experimental con cepas toxigénicas e invasivas de *Campylobacter jejuni*. En los pollitos control que no recibieron ciclofosfamida y fueron inoculados con las mismas cepas no se detectaron lesiones hepáticas (Cruickshank, 1986). Lo anterior sugiere que se requiere de un sistema inmune intacto y funcional para prevenir la diseminación de *Campylobacter jejuni* fuera del intestino (Blaser *et al*, 1983).

Los cambios histológicos atribuidos a *Campylobacter jejuni* en pollos incluyen congestión e infiltración mononuclear en la lámina propia de la mucosa intestinal. A las 48 horas post infección experimental se presenta atrofia de las vellosidades del íleon distal. La microscopía electrónica revela la presencia de campilobacterias dentro y entre las células epiteliales y la lámina propia y edema de la submucosa del yeyuno (Skanseng *et al*, 2006).

Métodos de diagnóstico

Hasta hace poco tiempo, los métodos utilizados para el diagnóstico han sido los mismos que fueron diseñados en sus principios básicos desde hace muchas décadas. Las técnicas microbiológicas y bioquímicas son tardadas y requieren de una especialización del personal que las realiza. Asimismo se ha hecho evidente la necesidad de desarrollar procedimientos que permitan detectar al patógeno en muestras muy contaminadas por otros microorganismos (Galán *et al*, 2004).

En promedio son necesarios entre 4 y 8 días para poder identificar la especie del género *Salmonella* hasta el nivel del subgrupo. En ocasiones resulta imposible aislar concentraciones bajas de salmoneras, lo cual cobra importancia por el carácter intermitente de la infección, en la que la concentración de las bacterias es variable y en su fase de baja multiplicación puede ser no detectable (Maciarovski *et al*, 2000).

La serotipificación de salmonelas en ocasiones se ve limitada por la escasez, el alto costo o la mala calidad de los antisueros, además de que más de 40% de los aislamientos no son tipificables por este método. La fagotipificación también ha sido desarrollada, e incluso se ha combinado el uso de serotipificación con fagotipificación para tipificar cepas de *Campylobacter* aisladas de humanos en el Reino Unido (Frost *et al*, 1999). Charlton *et al* (2005), redujeron a 3 días el diagnóstico con prueba de PCR y cultivo en medio de preenriquecimiento.

El aislamiento e identificación de *Campylobacter sp* es difícil porque es de lento crecimiento y se confunde fácilmente con bacterias del género *Arcobacter* y el mayor inconveniente es que se trata de organismos inertes que no metabolizan los azúcares que son empleados tradicionalmente para diferenciar las enterobacterias. Es por ello que *Campylobacter* requiere de la evaluación de su crecimiento bajo diferentes condiciones atmosféricas, de temperatura y de

sensibilidad antimicrobiana así como de la hidrólisis del hipurato y del acetato de indoxyl (Oyarzabal y Murphy, 1998).

Para realizar el aislamiento de *Campylobacter* se requieren muestras frescas de no más de dos horas, transportadas a 4°C en medio Cary Blair, debido a que si pasa más tiempo la cantidad de bacterias viables disminuye. Una práctica frecuente consiste en adicionar los medios de cultivo con antibióticos, sin embargo, algunas cepas de *Campylobacter sp* son sensibles y no crecen en su presencia, por ello se requiere el uso de al menos dos medios selectivos, uno con y otro sin antibióticos.

La serotipificación de *Campylobacter* se basa en dos esquemas, el de Penner que detecta los antígenos “O” por medio de la técnica de hemoaglutinación indirecta y el de Lior que detecta los antígenos proteicos termolábiles de superficie mediante la técnica de aglutinación en placa, ambos esquemas son complementarios (Lior *et al*, 1982, Penner, 1988).

Bülte y Jakob (1995) desarrollaron PCR para la detección de *Salmonella sp* en alimentos contaminados natural y artificialmente y además se han evaluado otros procedimientos como las sondas de ADN y las pruebas de ELISA.

Diversos métodos de PCR, sensibles y específicos, se han desarrollado para la detección de *Campylobacter sp* PCR se puede usar para detectar simultáneamente la presencia de otras bacterias patógenas de los alimentos, tales como *Salmonella* y *Listeria*. Aunque el primo aislamiento o el cultivo de las muestras no son indispensables, sí resultan convenientes porque incrementan la sensibilidad de las pruebas. El empleo del método de PCR reduce el tiempo de diagnóstico a menos de dos días (Phillips, 1995), además de que es capaz de detectar cantidades pequeñas de hasta una unidad formadora de colonia por mililitro de muestra (Skanseng *et al*, 2006).

Potencialmente PCR puede ser más fácil de realizar y más confiable que las pruebas bioquímicas, sin embargo la identificación por PCR no ha sido aceptada como método de rutina. Se han descrito métodos por PCR que detectan *Campylobacter* termofílicos directamente y algunos se basan en la amplificación de genes flagelares o ribosomales. En algunos métodos, el gen empleado se ha seleccionado por hibridación y no se ha caracterizado posteriormente. Además de los métodos de detección directa, se han diseñado algunos que requieren pre-enriquecimiento, filtrado, amplificación, electroforesis en gel seguido de Southern blotting o spot blots e hibridación. En estudios comparativos PCR ha resultado ser al menos tan sensible como las técnicas bioquímicas (Phillips, 1995; Al Rashid *et al*, 2000).

MATERIAL Y METODOS

Aves comerciales para el aislamiento primario

Se muestrearon semanalmente 30 pollos de engorda de la línea Ross desde su llegada a la granja hasta inmediatamente antes de ser enviados al rastro a las 7 semanas de edad. Las aves recibieron alimento y agua de bebida libre de antibióticos. Se realizó un estudio epidemiológico transversal para determinar la presencia de *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

Aislamiento de *Salmonella*

Las muestras consistieron en hisopos con material obtenido de la cloaca y se conservaron en medio de transporte de Stuart modificado. En el laboratorio los hisopos se colocaron en 10ml de caldo peptonado y mantenidos durante 2 horas a 40°C, posteriormente 2ml de cada tubo se depositaron en 20ml de caldo selenito - cistina y se incubaron durante 18 hrs a 37°C. Después, con un asa de nicromel, se sembró en agar Mac Conkey y agar XLD (Figura 1). Las cajas de agar fueron incubadas a 37°C y evaluadas a las 24 y 48 hrs post inoculación. A las colonias lactosa negativas se les hicieron pruebas bioquímicas (TSI, citrato, urea, MR-VP, SIM y azúcares) (Pietzch, 1984, Gutiérrez, 1993, Gutiérrez *et al*, 1995). Las cepas identificadas bioquímicamente se enviaron al InDRE para ser serotipificadas. En las aves SPF se realizó la necropsia y el cultivo se hizo a partir de: bazo, hígado, vesícula biliar, duodeno, yeyuno, íleon, ciegos y heces.

Aislamiento de *Campylobacter*

Las aves de granja fueron muestreadas mediante hisopos impregnados en la cloaca que fueron introducidos en medio de transporte de Cary Blair. En el laboratorio los hisopos fueron transferidos a 1ml de caldo *Brucella* y mantenidos durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente 10 microlitros de cada tubo se depositaron sobre papel filtro estéril (Milipore poro de 65 micras de diámetro) y los filtros impregnados se colocaron en cajas de agar MCC (medio para cultivo de *Campylobacter* con Carbón y polienriquecimiento Bioxon) (Figura 2), mismas que se incubaron durante 48 horas a 42°C en condiciones de microanaerobiosis. Las colonias que a la inspección tenían morfología compatible con *Campylobacter*, se re sembraron en agar sangre de carnero al 5% (Figura 3) y fueron sometidas a Tinción de Gram (-), Prueba de oxidasa (+), Prueba de catalasa (+), TSI: inerte, Prueba de hipurato: *C.jejuni* +, *C.coli*-, Reducción de nitratos (*C.coli* positivo, *C.jejuni* negativo), Ureasa (negativa), Tolerancia a TTC (tryphenyltetrazolim, *C.jejuni* y *C.coli* resistentes, y Tolerancia a NaCl (*C.jejuni* y *C.coli* sensibles) (Van Landuyt *et al* 1987, Lee *et al*, 1994, Petersen *et al*, 2001, Attenbury *et al*, 2003, Maher *et al*, 2003). En las aves SPF se realizó la necropsia y las muestras para cultivo se obtuvieron de: bazo, hígado, vesícula biliar, duodeno, yeyuno, íleon, ciegos y heces. También se muestreó a un grupo de 10 aves de la misma granja, que recibieron bacitracina en el alimento y cloro en el agua.

Animales de estudio

Se inocularon grupos de 5 aves ALPES de 4 semanas de edad, con los aislamientos de *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Tres semanas más tarde, las aves se sacrificaron para realizar diagnóstico histopatológico, obtener muestras para exámenes bacteriológicos y PCR. Las aves infectadas, así como las testigo se alojaron en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ UNAM,

bajo condiciones ambientales controladas y recibieron alimento libre de antibióticos y agua a libre acceso. Diariamente las aves fueron evaluadas mediante inspección clínica. Cada uno de los cinco grupos de aves se mantuvo aislado de los demás (Berchieri *et al*, 2001).

Preparación de inóculos

Salmonella

Las bacterias *S.enteritidis* y *S.typhimurium* se incubaron durante 18 hrs a 37°C en agar TSA (tripticosa Soya). Se tomó una asada de cada cultivo que fue disuelta en 7 ml de caldo TSA. La lectura se realizó en el espectrofotómetro (Thermospectronic Biomate 5) para asegurar una concentración de 1×10^8 UFC (unidad formadora de colonia).

El inóculo con la concentración mencionada, se administró a las aves por vía oral a razón de 1ml de caldo (Berchieri *et al*, 2001).

Campylobacter

Las bacterias *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* se incubaron durante 72 hrs a 37°C en agar MCC. Se tomó una asada de cada cultivo y se disolvió cada una en 7 ml de caldo *Brucella*. La lectura se realizó en el espectrofotómetro (Thermospectronic Biomate 5) hasta obtener una concentración de 1×10^9 UFC.

Inmediatamente que se obtuvieron los inóculos, se les administraron a las aves por vía oral a razón de 1ml de caldo (Ruiz-Palacios *et al*, 1981, Barrow y Page, 2000).

Modelo de infección

Las cinco aves de cada uno de los cinco grupos experimentales recibieron por vía oral un mililitro de caldo con el siguiente inóculo de acuerdo con el grupo: para el grupo 1, caldo *Brucella* sin bacterias, para el grupo 2, caldo Tripticasa Soya con 1×10^8 UFC de *Salmonella enteritidis*, para el grupo 3, caldo Tripticasa Soya con 1×10^8 UFC de *Salmonella typhimurium* (Nakamura *et al*, 1994, Berchieri *et al* 2001), para el grupo 4, caldo *Brucella* con 1×10^9 UFC de *Campylobacter jejuni* y para el grupo 5, caldo *Brucella* con 1×10^9 UFC de *Campylobacter coli* (Ruiz-Palacios *et al*, 1981).

Necropsia y toma de muestras

Se procesó un grupo de cinco aves por cada sesión. De cada ave, se tomó un hisopado de cloaca inmediatamente antes del sacrificio por dislocación de las vértebras cervicales (Paasch y Perusquia, 1985; Diario Oficial de la Federación, 1996).

La parte delantera de las aves fue empapada con alcohol industrial antes de incidir la cavidad abdominal y extraer los órganos y separarlos asépticamente para evitar la contaminación cruzada y empleando guantes e instrumental estéril para la colecta de las muestras bacteriológicas e histológicas en el siguiente orden: bazo, hígado, vesícula biliar (solo para bacteriológico y PCR), duodeno, yeyuno, íleon y ciegos (Berchieri *et al*, 2001).

Las muestras de órganos para bacteriología se conservaron en bolsas de plástico estériles y en refrigeración hasta ser sembradas en el laboratorio inmediatamente después de concluir la necropsia de todas las aves del grupo. Las muestras para histopatología se depositaron en frascos con formol neutro al 10%. Los tejidos para prueba de PCR se conservaron en congelación a -70°C hasta antes de su procesamiento.

Para los estudios histopatológicos las muestras de bazo, hígado, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos se fijaron por mas de 24 horas en formalina neutra al 10%, posteriormente fueron deshidratadas, incluidas en parafina, se obtuvieron cortes de las mismas en el microtomo y se tiñeron con hematoxilina eosina, conforme a los métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos, AFIP, (Prophet *et al*, 1995).

Técnica de PCR

ADN de tejidos

Se maceró 1 gramo de cada muestra en 1ml de PBS estéril, para posteriormente suspenderlas con 4µl de lisozima (20mg/ml), hasta obtener un volumen final de 1004µl que se incubó a 4°C durante 45 minutos. Después de la incubación, se adicionaron 12.5µl de proteinasa K (20mg/ml) y 250µl de solución STEP (10% de SDS, TRIS 1M, pH8, EDTA 0.5M, pH 8), obteniendo un volumen de 1266.5 µl al que se le realizó otra incubación durante 2 horas a 37°C. Se efectuó un proceso de extracción con fenol-cloroformo isoamílico, al volumen resultante de 1266.5 µl en una proporción de 25:24:1 y un volumen de cloroformo isoamílico. Después se agregaron dos volúmenes totales de etanol absoluto para precipitar el ADN, conservándose a -20°C hasta la realización de PCR (Maniatis *et al*, 1982).

ADN de cultivo puro

Los organismos cultivados en placa de agar (15 por 100 mm), se recuperaron en 1 ml de agua destilada y las muestras se hirvieron durante 20 minutos para la lisis bacteriana. Se realizó centrifugación a 10,000 X g durante 5 minutos y el sobrenadante fue empleado como templado de ADN para la amplificación de PCR (Maniatis *et al*, 1982, Bloom *et al*, 1995, Pacheco-Tena *et al*, 2001).

PCR *Salmonella enteritidis*

Se preparó una mezcla de 20 µl con los siguientes componentes: 2 µl de solución amortiguadora para PCR, 0.2mM de dNTP's, 1 mM de iniciadores, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µl de Taq polimerasa (2.5 unidades) y 9.3µl de agua destilada. En dicha mezcla se añadieron 3 µl de ADN de cada una de las muestras sometidas a extracción de ADN. Los iniciadores empleados fueron Inv 1F: 5'-CGT CAT TCC ATT ACC TAC CT-3'e Inv 1R: 5'-CAA TAG CGT CAC CTT TGA TA-'. Se utilizó el protocolo de PCR de 30 ciclos a 93°C por 45 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos seguido de una extensión final durante 4 minutos a 72°C (Rychlík *et al*, 1999). El producto amplificado (485pb) fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio.

PCR *Campylobacter*

Para PCR se tomaron 3 µl de ADN de cada una de las muestras sometidas a extracción de ADN y se agregaron a una mezcla de 27 µl de mezcla maestra: 15 pmol de cada primer, 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), Buffer para PCR 1X y 2.5 U de Taq polimerasa. Se emplearon los iniciadores 5'-GGC TGA TCT ACG ATT ACT AGC GAT-3' y 5'-GCG CGC ATT AGA TAC CCT AGT AGT CC-3'. El protocolo de PCR fue 30 ciclos: ciclos 1 a 5 a 96°C 2 min, 37°C 30 segundos y 72°C 30 segundos y los ciclos 6 a 30, 96°C 30 segundos, 52°C 30 segundos y 72°C 1 minuto. La amplificación de PCR fue completada con 10 minutos de extensión final a 60°C. El producto amplificado (600pb) fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio (Blom, *et al*, 1995, Pacheco-Tena *et al*, 2001).

PCR *Campylobacter jejuni*

Las reacciones de amplificación se efectuaron en un volumen total de 30µl (20mM Tris-HCl, pH 8.5, 1.5mM MgCl₂, 25 mM KCl, 100µg albúmina sérica bovina), 1 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0.5 U de Taq polimerasa. Se emplearon los iniciadores CJ1 5'-GAA-TGA-AAT-TTT-AGA-ATG-GGG-3' y CJ2 5'-GAT-ATG-TAT-GAT-TTT-TAT-CCT-GC-3'. El protocolo de PCR fue 30 ciclos: 94°C 1 min, 57°C 1 min y 72°C 1 min. La amplificación de PCR fue completada con 10 minutos de extensión final a 72°C. El producto amplificado (358 pb) fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio (Stonnet y Guesdon, 1993, Stonnet *et al*, 1995).

PCR *Campylobacter coli*

Las reacciones de amplificación se efectuaron en un volumen total de 30µl (20mM Tris-HCl, pH 8.5, 1.5mM MgCl₂, 25 mM KCl, 100µg albúmina sérica bovina), 1 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0.5 U de Taq polimerasa. Se emplearon los iniciadores CC1 5'-ATA-TTT-CCA-ACG-GCT-ACT-CCC-C-3' y CC2 5'-CAG-GCA-GTG-TGA-TAG-TCA-TGG-G-3'. El protocolo de PCR fue 30 ciclos: 94°C 1 min, 57°C 1 min y 72°C 1 min. La amplificación de PCR fue completada con 10 minutos de extensión final a 72°C. El producto amplificado (258 pb) fue detectado por electroforesis en geles de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio (Stonnet *et al*, 1995).

Análisis estadístico

Las diferencias entre las pruebas diagnósticas se evaluaron con la prueba de chi cuadrada (Davies y Wray, 1994, Hong *et al*, 2003).

La Tasa de positividad (TP) a las diferentes pruebas utilizadas (Calvin, 1977, Lerch, 1977), fue estimada de la siguiente forma:

$$TP = \frac{\text{No. de muestras positivas a la prueba (A.B., Ht, PCR)}}{\text{Total de muestras procesadas}}$$

DONDE:

A.B. = Aislamiento bacteriológico
Ht = Estudio histopatológico
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

Los cálculos se realizaron con un margen de error del 5% (Z=1.96) (Davies y Wray, 1996, Hong *et al*, 2003, Thrusfield, 1986, Thrusfield, 1990).

RESULTADOS

Aislamiento de *Salmonella* en granja

No se obtuvieron aislamientos de los muestreos de las primeras dos semanas. El tercer aislamiento fue positivo. Diez de treinta aves fueron positivas al aislamiento de *Salmonella sp*, de las cuales 8 fueron positivas a *S. enteritidis* y 2 a *Salmonella typhimurium* (Cuadro 1). Los aislamientos fueron corroborados con pruebas bioquímicas y serotipificación, determinando el antígeno somático "O" y el antígeno flagelar B, C, D, E. Para *Salmonella enteritidis* se obtuvo la caracterización: Grupo O: 9 (D1) 1, 9,12; g, m. Para *Salmonella typhimurium* Grupo O: (B) 1,4, 5, 12; i 1, 2.

Aislamiento de *Campylobacter* en granja

Los aislamientos de *Campylobacter* fueron posibles desde el primer muestreo y resultaron positivas 11 de 30 aves. En nueve de ellas se aisló *Campylobacter jejuni* y en 2 *Campylobacter coli* (Cuadro 2).

Cabe destacar que en el presente estudio no se obtuvieron aislamientos de un grupo de 10 aves muestreado de la misma granja que recibió bacitracina en el alimento y cloro en el agua.

Aislamientos de los órganos de las aves SPF inoculadas experimentalmente

Los aislamientos de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* se realizaron de hígado, vesícula biliar, íleon, ciegos y heces. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, se aislaron de los ciegos y de heces (Cuadro 3).

Histopatología de las aves SPF inoculadas experimentalmente

La lesión mas frecuente de las aves infectadas con *Salmonella enteritidis* fue la necrosis multifocal en el parénquima hepático con infiltración de células mononucleares (Figuras 4 y 5). Las lesiones intestinales se presentaron en yeyuno, íleon y ciego, siendo mas frecuentes en el íleon y consistieron en inflamación leve no supurativa (Figuras 7 y 8). En algunas aves se detectó depleción de las células linfoides en los centros germinales del bazo y en las placas de Peyer del íleon (Cuadro 4).

La lesión mas frecuente de las aves infectadas con *Salmonella typhimurium* fue la infiltración de células mononucleares en el parénquima hepático (Figuras 4 y 6). Las lesiones intestinales se presentaron en íleon y ciego, y consistieron en inflamación leve no supurativa (Figuras 7 y 9). En algunas aves se detectó depleción de las células linfoides en los centros germinales del bazo y en las placas de Peyer del íleon (Cuadro 5).

Las lesiones de las aves infectadas con *Campylobacter* se limitaron al íleon y ciegos y consistieron en infiltrado inflamatorio no supurativo de la lámina propia, sin embargo, en los ciegos se corroboró necrosis epitelial moderada en las aves infectadas con *Campylobacter coli* (Cuadros 6 y 7) (Figuras 10, 11 y 12).

Prueba de PCR

La prueba de PCR para *Salmonella enteritidis* Inv1F; Inv 1R, dio resultado positivo para el grupo de aves inoculado con *Salmonella enteritidis* en hígado, vesícula biliar, bazo, íleon y ciegos, resultado compatible con los aislamientos bacteriológicos, excepto que en éstos últimos el bazo fue negativo (Figuras 13 y 14). Las aves inoculadas con *Salmonella typhimurium*, dieron resultados negativos a PCR para *Salmonella enteritidis* en todos los órganos muestreados (Cuadro 8) (Figura 15).

La prueba de PCR para *Campylobacter sp* 16S, en las aves inoculadas con *Campylobacter jejuni*, dio resultado positivo en hígado, bazo, yeyuno íleon y ciegos, mientras que solamente se obtuvieron aislamientos bacteriológicos de ciegos (Figuras 16 y 17). Esta misma prueba aplicada a las aves inoculadas con *Campylobacter coli*, dio resultado positivo en los ciegos al igual que el aislamiento bacteriológico (Cuadro 9) (Figura 18).

La prueba de PCR para *Campylobacter jejuni* VS/15, VS/16, dio resultado positivo en las aves inoculadas con *Campylobacter jejuni* en hígado, bazo, yeyuno, íleon y ciegos. Las aves inoculadas con *Campylobacter coli* dieron resultados negativos a esta prueba en todos los órganos muestreados (Cuadro 10) (Figuras 19 y 20).

La prueba de PCR para *Campylobacter coli* CSF/CSR, dio resultado positivo en las aves inoculadas con *Campylobacter coli* en ciegos y resultado negativo en las aves inoculadas con *Campylobacter jejuni* en todos los órganos muestreados (Cuadro 11) (Figuras 21 y 22).

Cabe destacar que las pruebas de PCR detectaron heces positivas a los organismos específicos para las pruebas correspondientes en todas las aves inoculadas.

La tasa de positividad de las pruebas realizadas

La tasa de positividad de las pruebas realizadas para *Salmonella enteritidis* fue del 75% con PCR, del 50% con aislamiento bacteriológico y del 40% con histopatología (Cuadro 12). La tasa de positividad de las pruebas realizadas para *Campylobacter jejuni* fue del 75% con PCR, del 42% con histopatología y del 25% con aislamiento bacteriológico (Cuadro 13). La tasa de positividad de las pruebas realizadas para *Campylobacter coli* fue del 50% con PCR y del 25% con histopatología y con aislamiento bacteriológico respectivamente (Cuadro 14).

Al comparar las diferentes técnicas de diagnóstico empleadas para detectar la infección por los agentes estudiados en las aves SPF inoculadas, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre la prueba de aislamiento bacteriológico e histopatología en los tres agentes estudiados, pero que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre la prueba de PCR y el aislamiento bacteriológico y entre la prueba de PCR y la histopatología en los tres agentes estudiados (Cuadros 12, 13 y 14).

Cuadro 1. Frecuencia de aislamientos de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* en aves con exposición natural.

Muestreo	Frecuencia	Frecuencia Acumulada	Fracción	Proporción
1	0	0	0/30	0
2	0	0	0/30	0
3				
<i>S.enteritidis</i>	2	2	2/30	6.6
4				
<i>S.enteritidis</i>	2	4	4/30	13.3
5				
<i>S.enteritidis</i>	2	6	6/30	20
<i>S.typhimurium</i>	1	1	1/30	3.3
6				
<i>S.enteritidis</i>	2	8	8/30	26
<i>S.typhimurium</i>	1	2	2/30	6.6

Cuadro 2. Frecuencia de aislamientos de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en aves con exposición natural.

Muestreo	Frecuencia	Frecuencia Acumulada	Fracción	Proporción
1 <i>C.jejuni</i>	1	1	1/30	3.3
2 <i>C.jejuni</i>	1	2	2/30	6.6
3 <i>C.jejuni</i>	1	3	3/30	10
4 <i>C.jejuni</i>	2	5	5/30	16
5 <i>C.jejuni</i>	2	7	7/30	23
<i>C.coli</i>	1	1	1/30	3.3
6 <i>C.jejuni</i>	2	9	9/30	30
<i>C.coli</i>	1	2	2/30	6.6

Cuadro 3. Recuperación de *Salmonella* y *Campylobacter* de diferentes órganos y heces de aves SPF inoculadas con los aislamientos obtenidos de aves con exposición natural.

	Hígado	Bazo	Vesícula	Duodeno	Yeyuno	íleon	Ciego	Heces
Aves control negativo	-	-	-	-	-	-	-	-
Aves inoculadas con <i>S.enteritidis</i>	5/5	-	3/5	-	-	5/5	3/5	4/5
Aves inoculadas con <i>S.typhimurium</i>	1/5	1/5	-	-	-	-	1/5	4/5
Aves inoculadas con <i>C.jejuni</i>	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5
Aves inoculadas con <i>C.coli</i>	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5

Cuadro 4. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con *Salmonella enteritidis*.

Ave	Bazo	Hígado	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego
6	Ligera congestión	Ligera Inflamación no supurativa y necrosis multifocal discreta	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	SL
7	SL	Ligera Inflamación no supurativa y necrosis multifocal discreta	SL	Ligera inflamación no supurativa	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	Ligera inflamación no supurativa
8	Depleción	Ligera Inflamación no supurativa y necrosis multifocal discreta	SL	Ligera inflamación no supurativa s	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	SL
9	Depleción	Ligera Inflamación no supurativa y necrosis multifocal discreta	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	SL
10	Hiperplasia de células linfoides	Ligera Inflamación no supurativa y necrosis multifocal discreta	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	SL

SL = Sin lesión

Cuadro 5. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con *Salmonella typhimurium*.

Ave	Bazo	Hígado	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego
11	Depleción	Inflamación no supurativa multifocal	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas de Peyer	Ligera inflamación no supurativa
12	Depleción	Inflamación no supurativa multifocal	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas de Peyer	Ligera inflamación no supurativa
13	Depleción	Inflamación no supurativa multifocal	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	Ligera inflamación no supurativa
14		Inflamación no supurativa multifocal	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	Ligera inflamación no supurativa
15	SL	Inflamación no supurativa multifocal y congestión	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa en vellosidades y depleción linfoide de placas Peyer	Ligera inflamación no supurativa

SL = Sin lesión

Cuadro 6. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con *Campylobacter jejuni*.

Ave	Bazo	Hígado	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego
16	SL	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Ligera inflamación no supurativa
17	Ligera congestión	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Ligera inflamación no supurativa
18	Moderada congestión	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Ligera inflamación no supurativa
19	Ligera congestión y depleción linfoide	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Ligera inflamación no supurativa
20	Ligera congestión y depleción linfoide	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Ligera inflamación no supurativa

SL = Sin lesión

Cuadro 7. Lesiones observadas en las aves SPF inoculadas con *Campylobacter coli*.

Ave	Bazo	Hígado	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego
21	Ligera congestión y depleción linfoide	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Severa Inflamación no supurativa y necrosis
22	Ligera congestión	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Moderada Inflamación no supurativa y necrosis
23	Moderada congestión	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Moderada Inflamación no supurativa y necrosis
24	Ligera congestión y depleción linfoide	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Moderada Inflamación no supurativa y necrosis
25	Ligera congestión y depleción linfoide	SL	SL	SL	Ligera inflamación no supurativa	Severa Inflamación no supurativa y necrosis

SL = Sin lesión

Cuadro 8. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*. Inv1F; Inv 1R.

Resultado PCR <i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> Inv 1F Inv 1R	Bazo	Hígado	Vesícula biliar	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Heces
Tejidos de aves inoculadas con <i>S.enteritidis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+
Tejidos de aves inoculadas con <i>S.typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 9. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. 16S.

Resultado PCR <i>Campylobacter</i> <i>sp</i> 16S	Bazo	Hígado	Vesícula biliar	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Heces
Tejidos de aves inoculadas con <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
Tejidos de aves inoculadas con <i>Campylobacter</i> <i>coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

Cuadro 10. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter jejuni*. VS/15, VS/16.

Resultado PCR <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> VS15/VS16	Bazo	Hígado	Vesícula biliar	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Heces
Tejidos de aves inoculadas con <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
Tejidos de aves inoculadas con <i>Campylobacter</i> <i>coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 11. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. CSF/CSR.

Resultado PCR <i>Campylobacter coli</i> CSF/CSR	Bazo	Hígado	Vesícula biliar	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Heces
Tejidos de aves inoculadas con <i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Tejidos de aves inoculadas con <i>Campylobacter coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

Cuadro 12. Distribución de muestras positivas a las diferentes pruebas para detectar *Salmonella enteritidis*.

	Muestras positivas	
	No.	Tasa de positividad
PCR	30	75 ^a
Aislamiento bacteriológico	20	50 ^b
Histopatología	14	40 ^b

p<0.05 a, b. Letras diferentes por columna difieren estadísticamente.

Cuadro 13. Distribución de muestras positivas a las diferentes pruebas para detectar *Campylobacter jejuni*.

	Muestras positivas	
	No.	Tasa de positividad
PCR	30	75 ^a
Aislamiento bacteriológico	10	25 ^b
Histopatología	15	42 ^b

p<0.05 a, b. Letras diferentes por columna difieren estadísticamente.

Cuadro 14. Distribución de muestras positivas a las diferentes pruebas para detectar *Campylobacter coli*.

	Muestras positivas	
	No.	Tasa de positividad
PCR	20	50 ^a
Aislamiento bacteriológico	10	25 ^b
Histopatología	10	25 ^b

p<0.05 a, b. Letras diferentes por columna difieren estadísticamente.

DISCUSION

Según informes de la Unión Europea, la prevalencia de *Salmonella* en granjas avícolas es de 47.7% en Portugal, 33.7% en Hungría, 26.2% en Bélgica y 22.4% en Grecia. (Unión Europea, 2006). En nuestro estudio diez de treinta aves (33%) fueron positivas al aislamiento de *Salmonella sp*, de las cuales 8 fueron positivas a *Salmonella enteritidis* y 2 a *Salmonella typhimurium* en una granja comercial. Sin pretender inferir comparaciones a partir del muestreo de una sola granja, dadas las condiciones homogéneas en las que se lleva a cabo la avicultura contemporánea, nuestros hallazgos sugieren que la prevalencia en México de salmonelas en granjas avícolas es muy semejante a la de los demás países que tienen avicultura tecnificada.

Para *Salmonella enteritidis* se obtuvo la caracterización: Grupo O: 9 en nuestros aislamientos en granja, a este respecto, recientemente se ha propuesto que la erradicación de *Salmonella gallinarum*, abrió un nicho ecológico que permitió la introducción de *Salmonella enteritidis* en las parvadas. Debido a que el epítipo inmuno dominante del lipopolisacárido de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis* es el antígeno 09, se han desarrollado modelos matemáticos que predicen que la coexistencia de estos dos serotipos podría promover la competencia entre ellos y uno sería eliminado del hospedador (Gupta *et al*, 1996). En México solamente *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* se consideran dentro de la Campaña Nacional para el Control y Erradicación de la Salmonelosis Aviar, no obstante que en 1992 se planteó la propuesta de considerar también a *Salmonella enteritidis* por razones de salud pública (Diario Oficial, 1994). El antígeno vacunal contra *Salmonella*

gallinarum, al ser capaz de generar inmunidad en las parvadas contra el serotipo 09, podría generar inmunidad contra *Salmonella enteritidis* que eventualmente sería eliminada. Por razones de salud pública, resultaría interesante estudiar el uso de vacunas contra *Salmonella enteritidis* en las parvadas comerciales (Chacana *et al*, 2006).

En nuestro estudio, los aislamientos de *Campylobacter sp* fueron posibles desde el primer muestreo y resultaron positivas 11 de 30 aves. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* viven como comensales en el tracto intestinal de muchos animales incluyendo el pollo de engorda y por ello, las aves son uno de los alimentos que con mayor frecuencia se reportan asociados a brotes de *Campylobacter sp* (Pearson *et al*, 1996). El mecanismo por el cual *Campylobacter jejuni* es introducido en las parvadas de las aves no está claro, sin embargo existen diversas fuentes potenciales que incluyen agua, insectos, personal de la granja y roedores. Cuando se introduce, se disemina rápidamente e involucra al 100% de la parvada (Brandt *et al*, 1997).

En nuestro estudio, aunque solo resultó positiva una de cada tres aves, es evidente que la infección estaba presente en la parvada estudiada. Cabe considerar que el aislamiento e identificación de *Campylobacter* es difícil por su lento crecimiento y porque se trata de organismos inertes que no metabolizan los azúcares que son empleados tradicionalmente para diferenciar las enterobacterias. Es posible, por lo tanto, que entre las aves muestreadas, hayamos obtenido cierto número de falsos negativos en el cultivo bacteriológico y que la infección haya sido mayor.

En nuestro estudio, los aislamientos de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* de las aves inoculadas experimentalmente se obtuvieron de íleon y ciegos pero también de hígado y vesícula biliar, en este punto cabe recordar que los ciegos y el último tramo del intestino delgado, son los principales órganos de colonización de *Salmonella enteritidis*, Li *et al* (2003), sin embargo, cuando las bacterias invaden el epitelio y llegan a la lámina propia infectan a

los macrófagos y estas células le sirven de vehículo para invadir tejidos en otros órganos y sistemas (Kramer *et al*, 2003) de ahí los aislamientos del hígado y el hallazgo de que la lesión mas frecuente de las aves infectadas con *Salmonella sp* fue la necrosis multifocal en el parénquima hepático con infiltración de células mononucleares.

Campylobacter jejuni ha sido identificado en los folículos ováricos maduros e inmaduros de gallinas progenitoras (Cox *et al*, 2005), e incluso se han recuperado diferentes serotipos de la misma gallina, sin embargo los serotipos recuperados de los ovarios fueron diferentes a los recuperados de ciego. En nuestro estudio *Campylobacter jejuni*, dio resultado positivo a PCR en hígado, bazo, yeyuno íleon y ciegos, mientras que solamente se obtuvieron aislamientos bacteriológicos de ciegos. Esta misma prueba aplicada a las aves inoculadas con *Campylobacter coli*, dio resultado positivo en los ciegos al igual que el aislamiento bacteriológico. Aunque no se tomaron muestras de órganos reproductores, la presencia de *Campylobacter jejuni* en órganos parenquimatosos detectada a través de PCR, sugiere que este agente produce una infección sistémica y por ello nuestros resultados son compatibles con la noción de que la transmisión en las parvadas puede ocurrir tanto en forma horizontal como vertical, mientras que los resultados obtenidos con *Campylobacter coli* en aves inoculadas, apunta a una colonización limitada a los ciegos.

En México los serotipos de *Salmonella* más frecuentemente aislados son en orden decreciente *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella agona* y *Salmonella anatum* (Gutiérrez-Gogco *et al*, 2000).

En el presente estudio 8 de 30 aves de una granja convencional fueron positivas a *Salmonella enteritidis* y 2 a *Salmonella typhimurium* lo que sugiere que existe una relación proporcional semejante con los serotipos mas frecuentemente aislados en humanos. Resulta pertinente suponer que en México se presenta el mismo cambio en la epidemiología de *Salmonella sp*

que se ha dado en muchos países consistente en el surgimiento de infecciones en humanos provocadas por el consumo de alimentos contaminados por *Salmonella enteritidis*. Cabe destacar que también se aisló *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* en el presente estudio de aves aparentemente sanas, pero no se obtuvieron aislamientos de un grupo de aves muestreado de la misma granja que recibió bacitracina en el alimento y cloro en el agua, esto tiene relevancia en cuanto a la tendencia prevaleciente en el mundo que es la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *Salmonella sp* (Velge *et al*, 2005). Cabe destacar al respecto que en nuestro estudio existieron diferencias estadísticamente significativas entre la prueba de PCR y el aislamiento bacteriológico y que la tasa de positividad de las pruebas realizadas para *Salmonella enteritidis* fue del 75% con PCR y solo del 50% con el aislamiento bacteriológico. Es de considerar entonces que el uso del antibiótico bajó la concentración de bacterias a un nivel por debajo de la capacidad de aislamiento y existen informes en la literatura en los que se afirma que en ocasiones resulta imposible aislar concentraciones bajas de salmonelas (Maciarovski *et al*, 2000).

En México son escasos los reportes sobre la presencia de *Campylobacter* en animales para abasto y se desconoce su impacto en la salud, sin embargo, *Campylobacter jejuni* es la causa más frecuentemente de diarreas infecciosas agudas en los países desarrollados e incluso supera a las infecciones causadas por *Salmonella* y *Shigella* (Lamoureux *et al*, 1997). Dado que en nuestro estudio los aislamientos de *Campylobacter* fueron posibles desde el primer muestreo resultando positivas 11 de 30 aves aparentemente sanas y en el caso de todas las aves inoculadas experimentalmente, las pruebas de PCR detectaron heces positivas a los organismos específicos para las pruebas correspondientes, resulta pertinente suponer que en México deben ser frecuentes las infecciones por *Campylobacter sp en humanos* derivadas del consumo de alimentos de origen aviar, habida cuenta que el vehículo principal de transmisión a humanos es la carne cruda o insuficientemente cocida, principalmente la de pollo (Brooks *et al*, 1995).

En cuanto al diagnóstico el principal problema es que *Salmonella* y *Campylobacter* son habitantes del intestino de las aves y en ese medio crecen muchas especies de organismos bacterianos, por ello el aislamiento puede ser muy difícil si el número de organismos buscados es proporcionalmente muy bajo y ocultado por el crecimiento de los demás. En el presente estudio la prueba de PCR para *Salmonella enteritidis* Inv1F; Inv 1R, fue compatible con los aislamientos bacteriológicos, excepto que en éstos últimos fueron menos sensibles e incapaces de detectar los organismos en órganos positivos a PCR. Nuestras pruebas de PCR para la detección de *Salmonella*, además de su sensibilidad fueron altamente específicas ya que las aves inoculadas con *Salmonella typhimurium*, dieron resultados negativos a PCR para *Salmonella enteritidis* en todos los órganos muestreados.

El aislamiento e identificación de *Campylobacter* es difícil porque es de lento crecimiento, se confunde fácilmente con bacterias del género *Arcobacter* y requiere de la evaluación de su crecimiento bajo diferentes condiciones atmosféricas y de temperatura y de sensibilidad antimicrobiana así como de la hidrólisis del hipurato y del acetato de indoxyl (Oyarzabal y Murphy, 1998). La literatura revela muchas inconsistencias en las propiedades bioquímicas de los cultivos de *Campylobacter sp.*, por ejemplo se han reportado cepas de *Campylobacter jejuni* negativas al hipurato. Además se ha comprobado que algunas propiedades bioquímicas dependen de la edad del cultivo (Van Landuyt *et al*, 1987; Wassenaar y Newell, 2002). Por otro lado se ha cuestionado la utilidad de detectar organismos no cultivables por su supuesta insignificancia en términos de infectividad (Fearnley *et al*, 1996), sin embargo, debe tomarse en cuenta que ha sido posible detectar en huevo fértil *Campylobacter jejuni* no cultivables pero que han conservado su capacidad para adherirse a células HeLa (Cappelier *et al*, 1999).

Se ha demostrado que el método de PCR reduce el tiempo de diagnóstico a menos de dos días (Phillips, 1995), además de que es capaz de detectar

cantidades pequeñas de hasta una unidad formadora de colonia por mililitro de muestra (Skanseng *et al*, 2006).

En nuestros estudios la prueba de PCR para *Campylobacter jejuni* VS/15, VS/16, dio resultado positivo en las aves inoculadas en hígado, bazo, yeyuno íleon y ciegos, mientras que solamente se obtuvieron aislamientos bacteriológicos de ciegos, situación que es compatible con la sensibilidad arriba referida reportada en la literatura. Al igual que en el caso de *Salmonella*, la prueba de PCR en el presente estudio, también fue altamente específica, si se considera que la prueba de PCR para *Campylobacter jejuni* VS/15, VS/16, dio resultado negativo en las aves inoculadas con *Campylobacter coli* y la prueba de PCR para *Campylobacter coli* CSF/CSR, dio resultado negativo en las aves inoculadas con *Campylobacter jejuni*.

CONCLUSIONES

- Nuestros hallazgos sugieren que la prevalencia en México de *Salmonella sp* en granjas avícolas es semejante a la de los demás países que tienen avicultura tecnificada, se requieren estudios de prevalencia en segmentos representativos de la avicultura mexicana.
- De acuerdo con nuestros resultados, es probable que *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* vivan como comensales en el tracto intestinal del pollo de engorda en las parvadas comerciales en México, lo que indica la utilidad de realizar estudios que involucren segmentos representativos de la avicultura nacional.
- Nuestras evidencias de aislamientos en aves aparentemente sanas sugieren que existe una relación proporcional respecto a *Salmonella enteritidis* y a *Salmonella typhimurium* entre las parvadas comerciales y los aislamientos en humanos en México.
- En México deben ser frecuentes las infecciones por *Campylobacter* en humanos derivadas del consumo de alimentos de origen aviar por lo que resultan prioritarios los estudios epidemiológicos al respecto.
- El empleo del método de PCR, dada su sensibilidad y especificidad, es el indicado para la detección de *Salmonella* y *Campylobacter* en los animales, en los alimentos de origen animal y en el medio ambiente que sienten las bases para establecer marcadores epidemiológicos útiles en México.

LITERATURA CITADA

1. AGRICULTURE DEPARTMENT OF THE U.S.A. Food Safety Report 1999; Vol. 1, No. 13. April 21.
2. Al Rashid S, Dakuna I, Louie H, Ng D, Vandamme P, Jonson W and Chan VL. **Identification of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsalensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A.butzleri*-like species base don the glyA gene.** Journal of Clinical Microbiology 2000; 38:1488-1494.
3. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV. **Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals.** Microbiology Drug Resistance 2000; 6:77-83.
4. Asheg AA, Levkut M, Revajova V, Sevcikova Z, Kolodzieyski L, Pistl J. **Dynamics of Lymphocyte Subpopulations in Immune Organs of Chickens Infected with *Salmonella enteritidis*.** Acta Veterinaria Brno. 2003; 72:359-364.
5. Atterbury, RJ, Connerton, PL, Dodd CER, Rees CED and Connerton IF. **Isolation and Characterization of *Campylobacter* Bacteriophages from retail Poultry.** Applied Environmental Microbiology 2003; 69:4511-4518.
6. Barrow, PA, Page, K. **Inhibition of colonization of the alimentary tract in young chickens with *Campylobacter jejuni* by pre-colonization with strains of *C.jejuni*.** FEMS Microbiology Letters 2000; 182:87-91.
7. Barza M. **Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals.** Clinical Infectious Diseases 2002; 34 Suppl 3:S123-S125.

-
8. Black RE, Levine MM, Clements ML, Levine MM and Blaser MJ. **Human volunteer studies with *Campylobacter jejuni*** In: I Nachamkin, MJ Blaser and LS Tompkins (Eds.) *Campylobacter jejuni*, Current Status and Future Trends. Am Soc. Microbiol. Washington DC 1992:207-215.
 9. Blaser MJ, Smith PF, Repine JE and Joiner. **Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections.** Journal of Clinical Investigation 1983; 81:1434-1444.
 10. Beaumont C, Protais J, Guillot JF, Colin P, Proux K, Millet N, Pardon P. **Genetic resistance to mortality of day-old chicks and carrier state of hens after inoculation with *Salmonella enteritidis*.** Avian Pathology 1999; 28:131-135.
 11. Bercheri AJr, Wigley P, Page K, Murphy CK, Barrow PA. **Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage type 4 in chickens.** Avian Pathology 2001; 30:297-310.
 12. Blom, K, Patton, CM, Nicholson, MA and Swaminathan B. **Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA Probe Method.** Journal of Clinical Microbiology 1995; 33:1360-1362.
 13. Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imbereschts H, Mulvey MR. **Complete nucleotide sequence of a 43 kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT 104 and its identification in phage type DT 120 and serovar *Agona*.** Journal of Bacteriology 2001 d: 5725-5732.
 14. Bouvet P, Grimont P. **Données de surveillance 1999 du centre national de référence des *Salmonella* et *Shigella*.** Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire 2001; 12:1-9.
 15. Brandt, ER; Rollins DM, Mallinson ET, Carr L, Joseph SW. ***Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection.** Vaccine 1997; 15: No. 17/18:1922-1932.

-
16. Brooks BW; Robertson RH, Henning D, García MM. **Production and western blot characterization of monoclonal antibodies specific for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.** Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 1995; 4:155-164.
 17. Bülte, M. and Jakob, P. **The use of PCR- generated invA probe for the detection of *Salmonella spp* in artificially and naturally contaminated foods.** International Journal of Food Microbiology 1995; 26:335-344.
 18. Calvin W. **Epidemiology in Veterinary Practice.** Lea and Febiger Philadelphia. U.S.A. 1977:42-47.
 19. Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR and Federichi M. **Recovery in Embryonated Eggs of Viable but Nonculturable *Campylobacter jejuni* Cells and Maintenance of Ability To Adhere to HeLa Cells after Resuscitation.** Applied and Environmental Microbiology 1999; 65:5154-5157.
 20. Clark AG, and Bueschkens DH. **Survival and growth of *Campylobacter jejuni* in egg yolk and albumen.** Journal of Food Protection 1986; 49:135-141.
 21. Clarke RC and Gyles CL. **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** Iowa State University Pres, 1^a edition, 1986. Ames, Iowa, USA.
 22. Chacana PA and Terzolo HR. **Protection Conferred by a Live *Salmonella Enteritidis* Vaccine Against Fowl Typhoid in Laying Hens.** Avian Diseases 2006; 50:280-283.
 23. Charlton BR Walker RL, Kinde H, Bauer C, Channing-Santiago SE, Farver T. **Comparison of a *Salmonella enteritidis*-specific polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of *Salmonella enteritidis* in environmental drag swab samples.** Avian Diseases 2005; 49:418-422.
 24. Cogan TA, Humphrey TJ. **The rise and fall of *Salmonella enteritidis* in the UK.** Journal of Applied Microbiology 2003; 94:114S-119-S.
 25. Cox NA, Hofacre CL, Bailey JS, Buhr RJ, Wilson JL, Hiatt KL, Richardson LJ, Musgrove MT, Cosby DE, Tankson JD, Vizzier YL, Cray

-
- PF, Vaughn LE, Holt PS, Bourassa DV. **Presence of *Campylobacter jejuni* in various organs one hour, one day, and one week following oral or intracloacal inoculations of broiler chicks.** Avian Diseases 2005; 49:155-158.
26. Coyle EF, Palmer SR, Ribeiro CD, Jones HI, Howard AJ, Ward L, Rowe B. ***Salmonella enteritidis* phage type 4 infection: association with hen's eggs.** Lancet 1988; 2:1295-1297.
27. Cruickshank JG. ***Salmonella* and *Campylobacter* infections: an update.** Journal of Small Animal Practice 1986; 27:673-681.
28. Davies RH; Wray C. **An approach to reduction of *Salmonella* infection in broiler chicken flocks through intensive sampling and identification of cross-contamination hazards in commercial hatcheries.** International Journal of Food Microbiology 1994; 24:147-160.
29. Davies RH, Wray C. **Determination of an effective sampling regime to detect *Salmonella enteritidis* in the environment of poultry units.** Veterinary Microbiology 1996; 50: 117-127.
30. Delarocque AE, Desenclos JC, Bouvet P, Grimont PAD. **Risk factors for the occurrence of sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in children in France: a national case-control study.** Epidemiology and Infection 1998; 121:561-567.
31. Diario Oficial de la Federación. **NOM-005-ZOO. Campaña de control y erradicación de salmonelosis.** 1994. México, DF. 1º de septiembre de 1994.
32. Diario Oficial de la Federación. **NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.** 1996. México, DF. 16 de julio de 1996.
33. Doran JL, Collinson SK, Clouthier SC, Cebula TA, Koch WH, Burian J, Banser PA, Tood ECD, Kay WW. **Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars.** Molecular and Cellular Probes 1996; 10:2333-2346.

-
34. Duchet SM, Mompert F, Berthelot F, Beaumont C, Lechopier P, Pardon P. **Differences in frequency, level and duration of cecal carriage between four outbreed chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis***. Avian Diseases 1997; 41:559-567.
35. FAO/WHO. **WHO Surveillance programme for control of food borne infections and intoxications in Europe**. 1998. Published by FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses of the Federal Institute for Health protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) Berlin.
36. Fearnley CR, Ayling R, Cawthraw S and Newell DG. **The formation of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* and their failure to colonise one day old chicks**. In: D.G. Newell, J.M. Kettlely and R.A. Feldmann (Eds.) *Campylobacters, Helicobacters and Related Organisms*. Plenum Press, 1996:101-104.
37. Federighi M. ***Campylobacter* et hygiène des aliments**. 1999. Ed. Polytechnica. Paris, France.
38. Friedman CR, Malcom G, Rigau-Perez JG, Arambulo P, Tauxe RV. **Public health risk from *Salmonella*-based rodenticides**. Lancet 1996; 347:1705-1706.
39. Frost JA, Kramer JM and Gillanders SA. **Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping**. Epidemiology and Infection 1999; 123:47-55.
40. Galán ALC, Fuster VN, Marín MM, Rodríguez JJ. **Comparación entre técnicas tradicionales y rápidas en la evaluación de la contaminación de superficies y en la detección de *Salmonella***. Alimentación Equipos y Tecnología. 2004. Madrid, España.
41. Garber L, Smeltzer M., Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. ***Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in table egg layer house environments and in mice in USA layer houses and associate risk factors**. Avian Diseases 2003; 47:134-142.
42. Gast RK, Guard-Petter J, Holt PS. **Efect of prior serial in vivo passage on the frequency of *Salmonella enteritidis* contamination in eggs**

-
- from experimentally infected laying hens. *Avian Diseases* 2003 47: 633-639.
43. Goryo M, Suwa T, Matsumoto S, Umemura T and Itakura C. **Serial propagation and purification of chicken anemia agent in MDCC-MSB1 cell line.** *Avian Pathology* 1987; 16:149-163.
44. Guard PJ, Henzler DJ, Rahmann MM, Carlson RW. **On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and a model for its association with the production of contaminated eggs.** *Applied Environmental Microbiology* 1997; 63:1588-1593.
45. Gupta S, Maiden MC, Feavers IM, Nee S, May RM, Anderson RM. **The maintenance of strain structure in populations of recombining infectious agents.** *Natural Medicine* 1996; 2:437-442.
46. Gutiérrez-Castillo AC. **Detección de aves rectoras a *Salmonella gallinarum-pullorum* con las técnicas de aglutinación en placa, ELISA y aislamiento bacteriológico.** Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias: Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Junio de 1993.
47. Gutiérrez-Castillo AC, Fernández RP, Velásquez OV, Flores TM, Wray C. **Detección de aves rectoras a *Salmonella gallinarum-pullorum* con las técnicas de aglutinación en placa, ELISA y aislamiento bacteriológico.** *Veterinaria México*. 1995; 26(2):107.
48. Gutiérrez-Gogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. **Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México.** *Salud Pública de México*. 2000. 42:490-495.
49. Helmuth R, Schroeter A. **Molecular typing methods for *S. enteritidis*.** *International Journal of Food Microbiology* 1994; 21:69.
50. Henzler DJ, Opitz HM. **The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farms.** *Avian Diseases* 1992; 36:625-631.

-
51. Henzler DJ, Ebel E, Sanders J, Kradel D, Masson J. ***Salmonella enteritidis* in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks.** Avian Diseases. 1994; 38:37-43.
52. Hinton MH. **Infections and intoxications associated with animal feed and forage witch may present a hazard to human health.** Veterinary Journal 2000 Mar; 159 (2):124-138.
53. Hoerr JF. **Intestinal integrity and the impact of losing it.** Veterinary Diagnostic Laboratories, USA. <http://poultry-health.com/fora/inthelth/hoerr01.htm>. Fecha de consulta: Enero 17 de 2003.
54. Holt PS and Porter RE. **Microbiological and histopathological effects of an induced-molt fasting procedure on a *Salmonella enteritidis* infection in chickens.** Avian Diseases 1992; 36:610-618.
55. Holt PS. **Molting and *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infection: the problem and some solutions.** Poultry Science 2003; 82:1008-1010.
56. Hong Y, Berrang ME, Liu R, Hofacre CL, Sánchez S, Wang L and Maurer J. **Rapid detection of *Campylobacter coli*, *C.jejuni* and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-Enzyme Linked Immunosorbent assay.** Applied and Environmental Microbiology 2003; 69:3492-3499.
57. Hoop RK and Pospischil S. **Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with naturally acquired *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection.** Veterinary Record 1993; 133:391-393.
58. Hooper SA and Mawer S. ***Salmonella enteritidis* in commercial layer flock. Acquired *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection.** Veterinary Record.1988;123:351
59. Humphrey TJ. **Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review.** International Journal of Food Microbiology. 1994; 21:31-40.

-
60. **INFOSAN Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los alimentos.** Nota de información INFOSAN 3/2005-*Salmonella*. 13 de abril de 2005.
61. Kapperud G, Stenwig H. and Lassen J. **Epidemiology of *Salmonella typhimurium* 0:4-1 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir.** American Journal of Epidemiology 1998; 147(8):774-782.
62. Klipstein FA, Engert RF, Short H and Schenk EA. **Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: Assay and correlation with clinical manifestations.** Infection and Immunity 1985; 50:43-49.
63. Kramer J, Visscher AH, Wagenaar JA, Jeurissen SHM. **Entry and survival of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines.** Veterinary Microbiology 2003; 91:147-155.
64. Lamoureux M, Mackay A, Messier S, Fliss I, Blais BW, Holley RA and Simmard RE. **Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separations and microtitre hybridation.** Journal of Applied Microbiology 1997; 83:641-651.
65. Lee Chia-Yin, Tai CL, Lin SC, Chen Y.T. **Ocurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples.** International Journal of Food Microbiology 1994; 24:161-170.
66. Lerch G. La experimentación en las ciencias biológicas y agropecuarias. Editorial Científico Técnica. La Habana, Cuba 1977:179-188.
67. Li W, Watarai S, Hirshi K. **Identification of possible chicken intestinal mucosa receptors for SEF21-fimbriated *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*.** Veterinary Microbiology 2003; 91:215-229.
68. Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. **Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors.** Journal of Clinical Microbiology 1982; 15:761-768.

-
69. Maciarovski KG, Pillai SD, Ricke SC. **Efficacy of a commercial polymerase chain reaction-based assay for detection of *Salmonella* spp. in animal feeds.** Journal of Applied Microbiology 2000; 89:710-718.
70. Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carrol C and Cormican M. **Evaluation of Culture Methods and DNA Probe-Based PCR Assay for Detection of *Campylobacter* Species in Clinical Specimens of Feces.** Journal of Clinical Microbiology 2003; 41:2980-2986.
71. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. Cold Spring Harbor, N.Y.
72. Martin G, Barrow PA, Berchieri A, Methner U and Meyer H. **Inhibition phenomena between *Salmonella* strains – a new aspect of *Salmonella* infection control in poultry.** DTW *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1996; 103(11):468-472.
73. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. **Food Hygiene-Report on Consumer Survey**, Her Majesty's Stationery Office, 1988, London, UK.
74. Mollenhorst H, Van Woudenberg CJ, Bokkers EGM, and Boer IJM. **Risk factors for *Salmonella enteritidis* infection in laying hens.** Poultry Science 2005; 84(8): 1308-1313.
75. Nakamura M, Nagamine N, Takahashi R, Suzuki S, Kijima M, Yutaka T, Sato S. (1994) **Horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* and effect of stress on shedding in laying hens.** Avian Diseases 1994; 38:282-288.
76. Neill SD, Campbell NJ, Greene JA. ***Campylobacter* species in broiler chickens.** Avian Pathology 1984; 13:777-785.
77. Neimann J, Engberg J, Molbak K, Wegener HC. **Risk Factors associated with sporadic campylobacteriosis in Denmark.** 4th World Congress, Food borne Infections and intoxications, Berlin, 7-12 June, 1998.
78. Nielsen EM, Nielsen NL. **Serotypes and typability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry products.** International Journal of Food Microbiology 1999; 46:199-205.

-
79. Nygard K, De Jong B, Guerin PJ, Anderson Y, Olsson A, Giesecke J. **Emergence of new *Salmonella Enteritidis* phage types in Europe? Surveillance of infections in returning travelers.** 2004. BMC Medicine 2:32.
80. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA **Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation.** Nature 2000; 405:299-304.
81. Organización Mundial de la Salud. **Control de la salmonelosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Informe de un comité de expertos de la OMS.,** Ginebra, 1988:71-75.
82. Organización Mundial de la Salud. **Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective.** Emerging Infections Diseases 1997; Apr-Jun; 3(2):223-8.
83. Oyarzabal O, Murphy B, ***Campylobacter* and *Arcobacter*.** International food Hygiene 1998; 9:29-30.
84. Paasch ML, Perusquia JMT. **Necropsia de aves.** 1985. Editorial Trillas.
85. Pacheco-Tena C, Alvarado de la Barrera C, López-Vidal Y, Vázquez-Mellado J, Richaud-Patin Y, Amieva RI, Llorente L, Martínez A, Zúñiga J, Cifuentes-Alvarado M, Burgos-Vargas R. **Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies.** Rheumatology 2001; 40:920-927.
86. Padrón N. ***Salmonella typhimurium* outbreak in broilers chickens flocks in México.** Avian Diseases 1990; 34:221-223.
87. Pearson AD, Greenwood MH, Feltham RK, Healing TD, Donaldson J, Jones DM, Colwell RR. **Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission and amplification by flock propagation.** Applied Environmental Microbiology 1996; 62:4614-4620.
88. Penner JL. **The genus *Campylobacter*: a decade of progress.** Clinical Microbiology Review 1988; 1:157-172.

-
89. Petersen L, Nielsen EM, On SWL. **Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks.** *Veterinary Microbiology* 2001; 82:141-145.
90. Phillips CA. **Incidence, epidemiology and prevention of food borne *Campylobacter* species.** *Trends in Food Science & Technology* 1995; 6: 83-87.
91. Pietzch, O. **Methods of the detection of *Salmonella* Standardization and harmonization of the procedure.** International Symposium on Salmonella, New Orleans, Lou. July 1984; 19-20, 7-14.
92. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. **Métodos Histotecnológicos.** Preparado por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) y publicado por el Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP). Washington D.C. 1995. ISSN: 1-881041-21-2.
93. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. **Supplement 2001 (No.45) to the Kauffmann-White scheme.** *Research Microbiology* 2003; 154:173-174.
94. Porter RE and Holt PS. **Effect of induced molting on the serverity of intestinal lesions caused by *Salmonella enteritidis* infection in chickens.** *Avian Diseases* 1993; 37:1009-1016.
95. Riddel C. **Avian histopathology.** Published by American Association of Avian Pathologist Inc. Second Edition 1996, Canada. Cap. 7:111:141.
96. Ruchlík I, Van Kesteren L, Cardová L, Svestková A, Martínková R. and Sisák F. **Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase Chain reaction.** *Letters in Applied Microbiology* 1999; 29:269-272.
97. Ruiz-Palacios GM, Escamilla E, Torres N. **Experimental *Campylobacter* Diarrhea in Chickens.** *Infection and Immunity* 1981; 34:250-255.
98. Sanyal SC, Islam KMN, Neogy PKB, Islam M Speelman P and Huq MI. ***Campylobacter jejuni* diarrhoea model in infant chickens.** *Infection and Immunity* 1984; 43:931-936.

-
99. Secretaría de Salud Pública. Estadísticas. www.salud-sonora.gob.mx/estadis.htm. Boletín epidemiológico 2000. www.salud-sonora.gob.mx/bole-s.htm. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2000.
100. Shivaprasad HL, Timoney JF, Morales S, Lucio B, Baker RC. (1990) **Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serological responses.** Avian Diseases 1990; 34:548-557.
101. Skanseng B, Kaldhusdal M and Knut R. **Comparison of chicken gut colonisations by pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR.** Molecular and Cellular Probes. 2006; 20:269-279.
102. Stonnet V and Guesdon JL. ***Campylobacter jejuni*: Specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis.** FEMS Immunology and Medical Microbiology 1993; 7:337-344.
103. Stonnet V, Sicinschi L, Mégraud F, Guesdon JL. **Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Clinical Specimens Using the Polymerase Chain Reaction.** European Journal of Microbiology Infectious Diseases. 1995; 14: 355-359.
104. Talibart R, Denis M, Castillo A, Cappelier JM, Ermel G. **Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm.** International Journal of Food Microbiology 2000; 55:263-267.
105. Threlfall EJ, Ridley AM, Ward LR, Rowe B. **Assessment of health risk from *Salmonella*-based rodenticides.** Lancet 1996; 348:616-617.
106. Thrusfield M. **Veterinary Epidemiology.** Butterworth and Co. Publishers LTD. 1986. London England, Cap. 9, 104, Cap 14:153-164, Cap. 15:166-174.
107. Thrusfield M. **Epidemiología Veterinaria.** Ed. Acribia, S.A. 1990, Zaragoza, España Cap.9: 130, Cap.13:180.

-
108. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. **Host adapted serotypes of *Salmonella enterica***. *Epidemiology Infection* 2000; 125: 229-255.
109. Unión Europea **Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002**. European Commission, health and consumer protection. http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/salmonella/zoonoses_reps_2002_en.htm. Fecha de consulta 29 de septiembre de 2004.
110. Unión Europea. **Informe de la EFSA sobre *Salmonella* en la UE**. http://www.efsa.eu.int/science/monitoring_zoonoses/reports/1541/zdc_salmonella_report_ej81_layinghens_en1.pdf. Fecha de consulta: 3 de julio de 2006. 36:267-288.
111. Van Landuyt HW, Fossépré JM and Gordts B. **A blood free medium for isolation of thermophilic *Campylobacter* species**. *European Journal of Clinical Microbiology* 1987; 6:201-203.
112. Van de Giessen AW, Ament AJHA, Notermans SHW. **Intervention strategies for *Salmonella enteritidis* in poultry flocks: a basic approach**. *International Journal of Food Microbiology* 1994; 21:145-154.
113. Van Pelt W, de Wit MA, Wannet WJ, Ligtvoet EJ, Widdowson MA, Van Duynhoven YT. **Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001**. *Epidemiology and Infection* 2003; 130:431-441.
114. Velge P, Cloeckert A, Barrow P. **Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in multiple antibiotic resistance in other major serotypes**. *Veterinary Research* 2005; 36:267-288.
115. Ward LR, De Sa JD, Rowe B. **A phagotyping scheme for *Salmonella enteritidis***. *Epidemiology and Infection* 1987; 99: 291-294.
116. Ward LR, Therefall J, Smith HR, O'Brien SJ, Riemann H, Kass P, Cliver D, Bäumlér AJ, Hargis BM, Tsoilis RM. ***Salmonella enteritidis* epidemic**. *Science* 2000; 287:1753-1754.

-
117. Wassenaar TM and Newell DG. The Genus *Campylobacter*
<http://141.150.157.117/prokPUB/chaphtmter>
http://141.150./305/01_00.htm 7/10/2002. Fecha de consulta mayo de 2002.
118. Welkos SL. **Experimental gastroenteritis in newly-hatched chicks infected with *Campylobacter jejuni*.** Journal of Med Microbiology 1984; 18:233-248.
119. Wierup M, Engström B, Engavall A, Wahlström H. **Control of *Salmonella enteritidis* in Sweden.** Food Microbiology 1995; 25:219-226.
120. Yang YJ, Huang MC, Wang SM, Wu JJ, Cheng CP and Liu CC. **Analysis of risk factors for bacteremia in children with nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis.** Eur. J. Clín. Microbiol. Infectious Diseases 2002; 21:290-293.
121. Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, White DG, Wagner D and Meng J. **Prevalence of *Campylobacter sp*, *Escherichia coli*, and *Salmonella serovars* in retail chicken, turkey, pork and beef from the greater Washington, D.C., area.** Applied Environmental Microbiology 2001; 67:5431-5436.

ANEXOS



FIGURA 1. Cultivo bacteriano de *Salmonella enteritidis* en Agar Mac Conkey y Agar XLD.

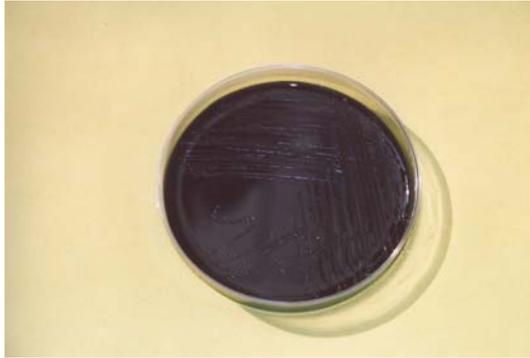


FIGURA 2. Cultivo bacteriano de *Campylobacter jejuni* en Agar MCC.



FIGURA 3. Cultivo bacteriano de *Campylobacter coli* Agar sangre de carnero.

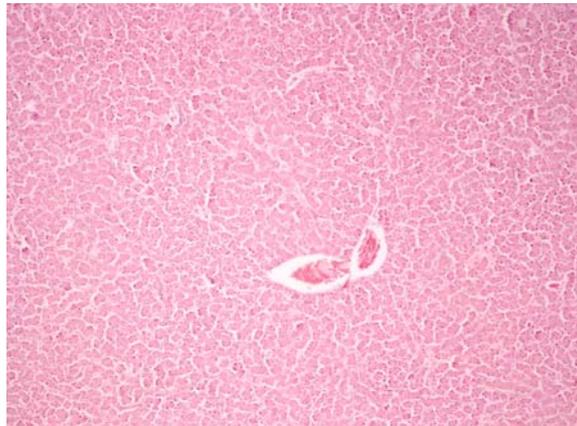


FIGURA 4. Hígado. Normal. 10X. Tinción Hematoxilina Eosina.

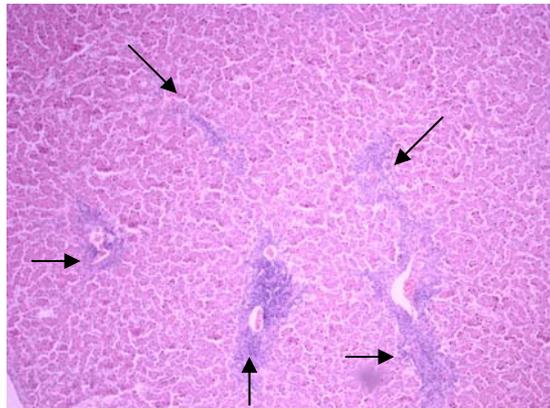


FIGURA 5. Hígado. Ave inoculada con *Salmonella enteritidis*. Severa necrosis multifocal con infiltración de células mononucleares. 10X. Tinción Hematoxilina Eosina.

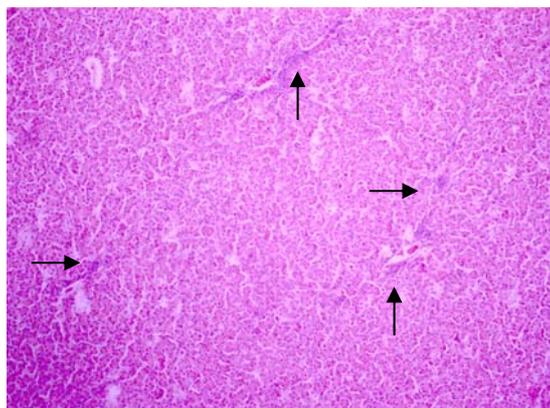


FIGURA 6. Hígado. Ave inoculada con *Salmonella typhimurium*. Ligera necrosis multifocal con infiltración de células mononucleares. 10X. Tinción Hematoxilina Eosina.

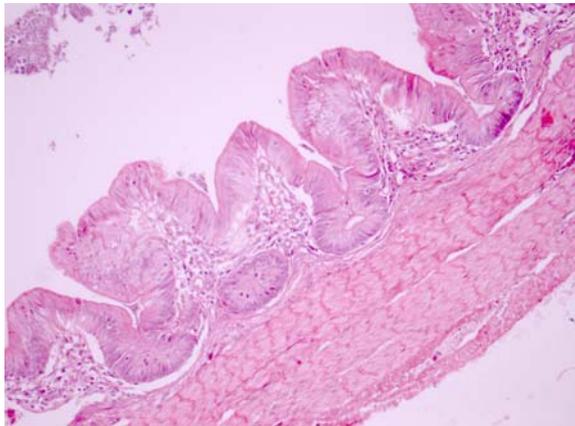


FIGURA 7. Ciego. Normal. 20X. Tinción Hematoxilina Eosina.



FIGURA 8. Ciego. Ave inoculada con *Salmonella enteritidis*. Inflamación leve no supurativa. 20X. Tinción Hematoxilina Eosina.

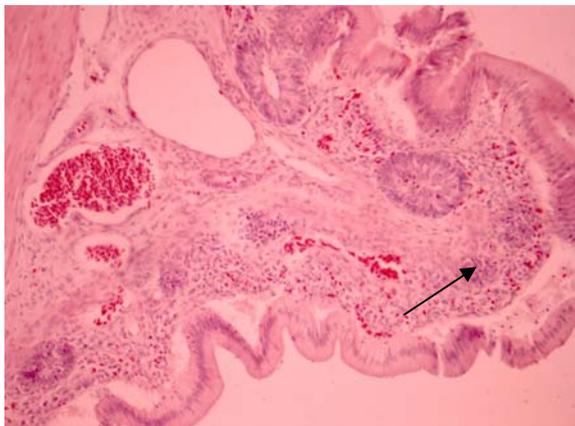


FIGURA 9. Ciego. Ave inoculada con *Salmonella typhimurium*. Inflamación leve no supurativa. 20X. Tinción Hematoxilina Eosina.

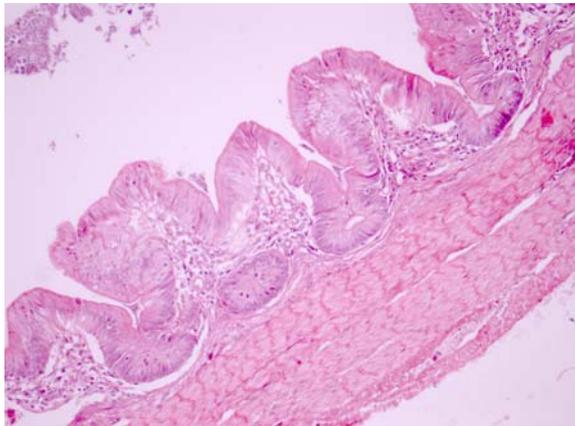


FIGURA 10. Ciego. Normal. 20X. Tinción Hematoxilina Eosina.

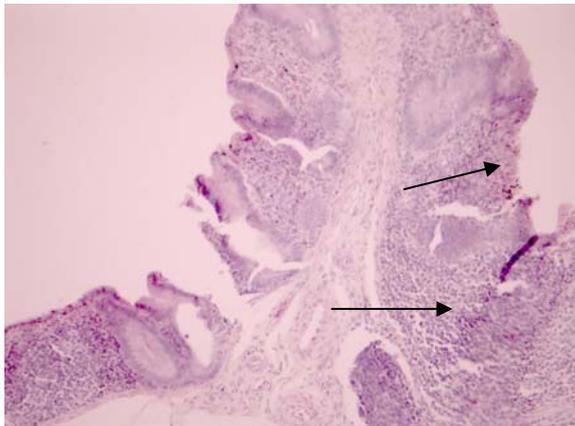


FIGURA 11. Ciego. Ave inoculada con *Campylobacter jejuni*. Infiltrado inflamatorio no supurativo y necrosis moderada. 20X. Tinción Hematoxilina Eosina.

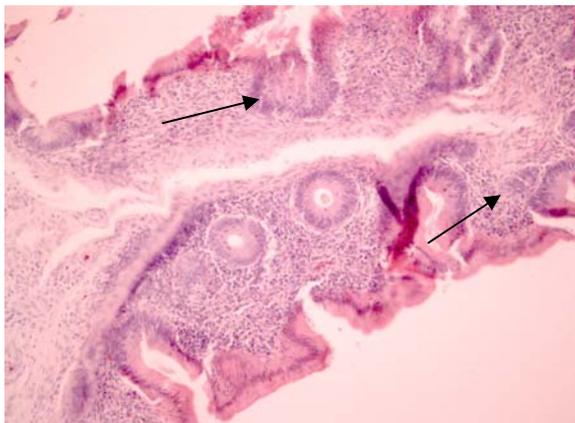


FIGURA 12. Ciego. Ave inoculada con *Campylobacter coli*. Infiltrado inflamatorio no supurativo y necrosis moderada. 20X. Tinción Hematoxilina Eosina.

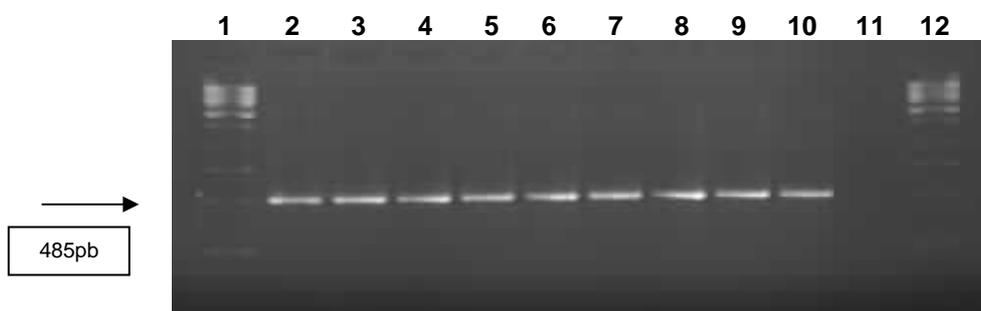


FIGURA 13. Prueba de PCR en cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas en granja. El producto amplificado específico para *Salmonella enteritidis*, indicado con la flecha (485pb), fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio. Carriles 1 y 12 marcador de peso molecular 1Kb. Carriles 2 control positivo. Carriles al 3 al 10 cepas de *Salmonella enteritidis* confirmadas. Carril 11 control negativo.

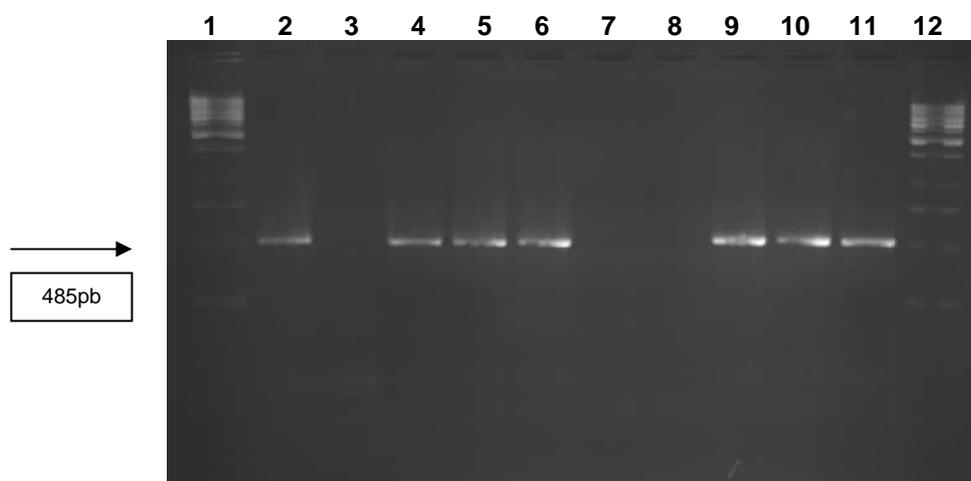


FIGURA 14. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *S.enteritidis*. Inv1F; Inv 1R. Carriles 1 y 12 Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2 Control positivo. Carril 3 Control negativo. Carril 4 Bazo. Carril 5 Hígado. Carril 6 Vesícula biliar. Carril 7 Duodeno. Carril 8 Yeyuno. Carril 9 Íleon. Carril 10 Ciego, Carril 11 Heces. El producto amplificado específico para *Salmonella enteritidis*, indicado con la flecha (485pb).



FIGURA 15. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *S.thyphimurium*. Inv1F; Inv 1R. Carriles 1 y 12 Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2 Control positivo. Carril 3 Control negativo. Carril 4 Bazo. Carril 5 Hígado. Carril 6 Vesícula biliar. Carril 7 Duodeno. Carril 8 Yeyuno. Carril 9 Íleon. Carril 10 Ciego, Carril 11 Heces. El producto amplificado específico para *Salmonella enteritidis*, indicado con la flecha (485pb).

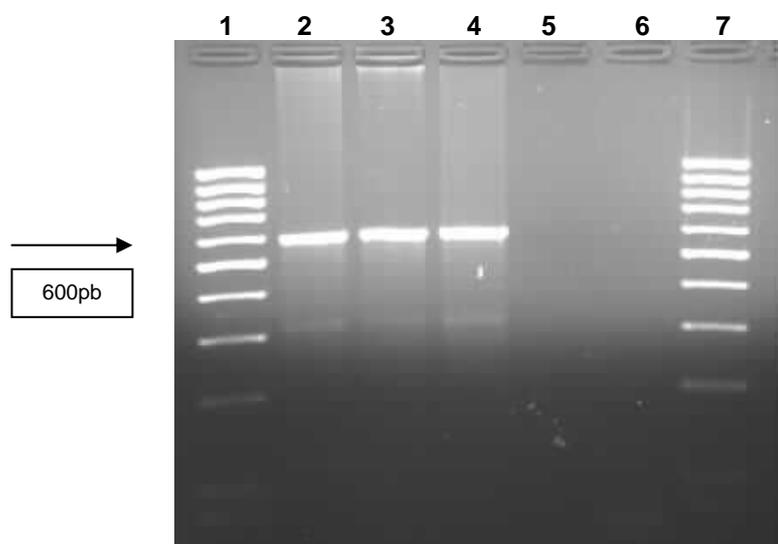


FIGURA 16. Prueba de PCR en cepas de *Campylobacter sp.* aisladas en granja. El producto amplificado específico para 16S de *Campylobacter sp* (600pb), indicado con flecha, fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio: Carriles 1 y 7 Marcador de peso molecular 100pb. Carriles 2, 3 y 4 Cepas de *Campylobacter sp.*

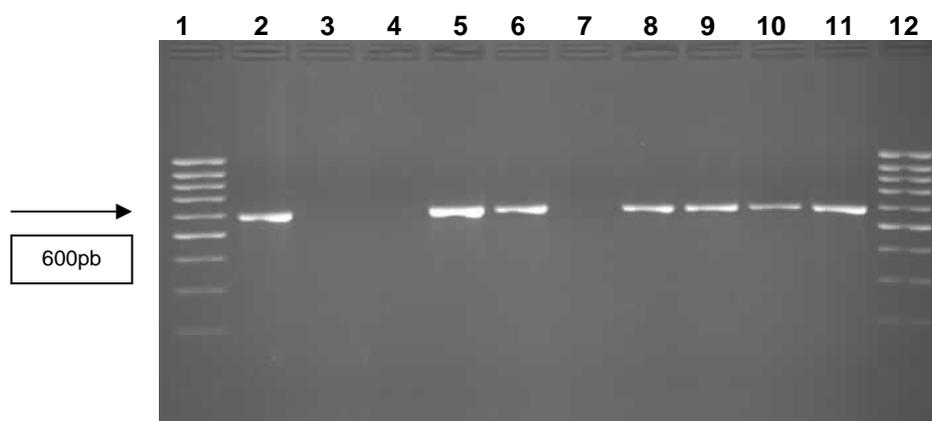


FIGURA 17. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter jejuni*. 16S. Carriles 1 y 12 Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 Control positivo. Carril 3 Control negativo. Carril 4 Bazo. Carril 5 Hígado. Carril 6 Vesícula biliar. Carril 7 Duodeno. Carril 8 Yeyuno. Carril 9 Íleon. Carril 10 Ciego, Carril 11 Heces. El producto amplificado específico para 16S de *Campylobacter sp* (600pb), indicado con flecha.

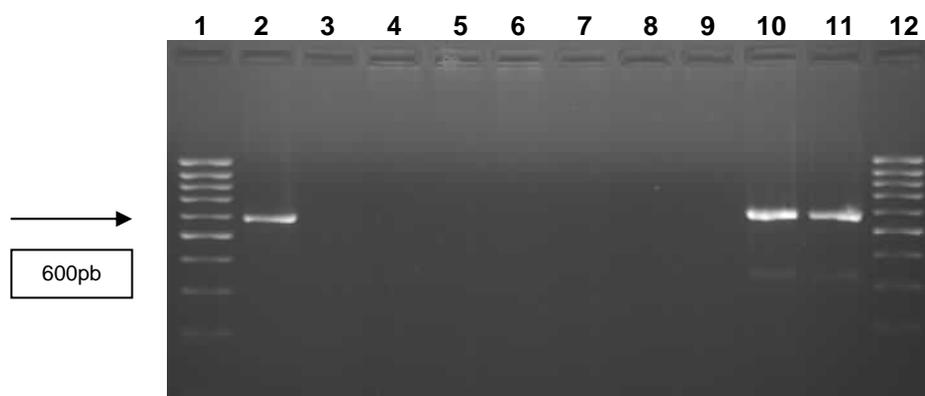


FIGURA 18. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter coli*. 16S. Carriles 1 y 12 Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 Control positivo. Carril 3 Control negativo. Carril 4 Bazo. Carril 5 Hígado. Carril 6 Vesícula biliar. Carril 7 Duodeno. Carril 8 Yeyuno. Carril 9 Íleon. Carril 10 Ciego, Carril 11 Heces. El producto amplificado específico para 16S de *Campylobacter sp* (600pb), indicado con flecha.

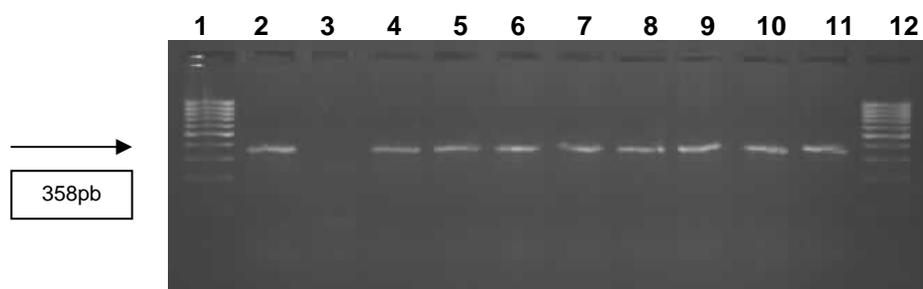


FIGURA 19. Prueba de PCR en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas en granja. El producto amplificado específico para VS/15, VS/16 (358pb), indicado con la flecha, fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio. Carriles 1 y 12 marcador de peso molecular 100pb. Carriles 2 control positivo. Carril 3 Control negativo. Carriles 4 al 11 cepas de *Campylobacter jejuni* confirmadas. Carril 11 control negativo.

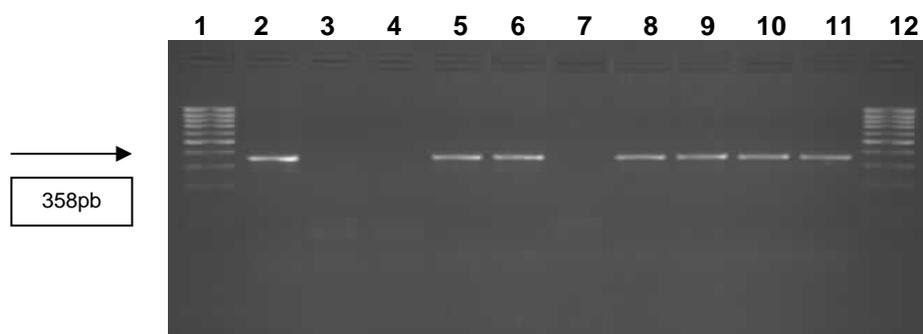


FIGURA 20. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter jejuni*. VS/15, VS/16. Carriles 1 y 12 Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 Control positivo. Carril 3 Control negativo. Carril 4 Bazo. Carril 5 Hígado. Carril 6 Vesícula biliar. Carril 7 Duodeno. Carril 8 Yeyuno. Carril 9 Íleon. Carril 10 Ciego, Carril 11 Heces. El producto amplificado específico para VS/15, VS/16 (358pb).

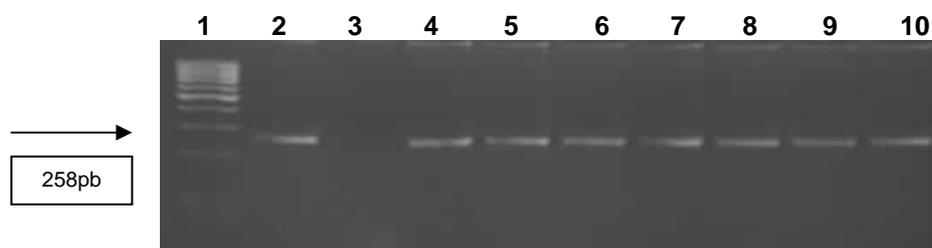


FIGURA 21. Prueba de PCR en cepas de *Campylobacter coli* aisladas en granja. El producto amplificado específico CSF/CSR (258 pb), indicado con la flecha, fue detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1XTris-Borato-EDTA en presencia de bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 control positivo. Carril 3 Control negativo. Carriles 4 al 10 cepas de *Campylobacter coli* confirmadas.



FIGURA 22. Prueba de PCR en tejidos de aves SPF inoculadas con *Campylobacter coli*. CSF/CSR. Carriles 1 y 12 Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 Control positivo. Carril 3 Control negativo. Carril 4 Bazo. Carril 5 Hígado. Carril 6 Vesícula biliar. Carril 7 Duodeno. Carril 8 Yeyuno. Carril 9 Íleon. Carril 10 Ciego, Carril 11 Heces. El producto amplificado específico CSF/CSR (258 pb), indicado con la flecha.