

**Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria**

“Detección de *Salmonella* spp. en fecas de terneros de predios lecheros de tamaño superior a 100 hectáreas en la comuna de Paillaco.”

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

**LADISLAO ALEJANDRO BARRIENTOS PUGA
VALDIVIA – CHILE
2005**

PROFESOR PATROCINANTE

: DRA. ERIKA GESCHE R.

PROFESORES CALIFICADORES

: DRA. CARMEN GALLO S.

: DR. HERIBERTO FERNÁNDEZ J.

FECHA DE APROBACIÓN

: 8 DE ABRIL, 2005.

A MI MADRE Y MI FAMILIA

ÍNDICE

	Pág.
1 RESUMEN	1
2 SUMMARY	2
3 INTRODUCCIÓN	3
4 MATERIAL Y MÉTODO	9
5 RESULTADOS	12
6 DISCUSIÓN	15
7 CONCLUSIONES	21
8 BIBLIOGRAFÍA	22
9 AGRADECIMIENTOS	29

1. RESUMEN

“Detección de *Salmonella* spp. en fecas de terneros de predios lecheros de tamaño superior a 100 hectáreas en la comuna de Paillaco.”

Salmonella spp. es un patógeno entérico de suma importancia en salud pública, siendo en los países industrializados el segundo agente etiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), causando cuantiosas pérdidas económicas. *Salmonella* spp. es motivo de constante vigilancia de laboratorio por la permanente resistencia a antibióticos que desarrolla la bacteria. Diversos animales de vida silvestre, compañía y de abasto han sido descritos como fuente de contaminación para la población humana. El ganado bovino como portador de la bacteria, más común en predios lecheros, ha sido estudiado desde diversos puntos de vista, siendo uno de ellos, el identificar predios positivos a *Salmonella* spp. mediante el análisis bacteriológico de material fecal. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Salmonella* spp. en heces de terneros aparentemente sanos de predios lecheros de la comuna de Paillaco y la tipificación serológica de las cepas obtenidas.

Las muestras fecales fueron obtenidas desde la porción final del intestino grueso de terneros aparentemente sanos, constituyendo un pool de material fecal en cada predio muestreado. Para el análisis bacteriológico, se incubaron en Agua Peptonada Tamponada (APT), 25 gramos de heces a 35° C durante 16 a 20 horas. Posteriormente, se sembró en caldo Rappaport-Vassiliadis 0,1 ml del cultivo proveniente del caldo APT y se incubó a 42° C por 24 horas, además se sembró en caldo Tetracionato 1 ml del cultivo proveniente del caldo APT y se incubó a 35° C por 24 horas. Después de este período de incubación se sembró en agar XLD con material proveniente de ambos caldos de cultivo, incubando las placas a 35° C por un tiempo de 24 horas. Las colonias que resultaron sospechosas se sometieron a confirmación bioquímica y posteriormente fueron tipificadas serológicamente.

De un total de 28 predios lecheros analizados, 4 resultaron positivos a *Salmonella* spp, correspondiendo a una frecuencia de 14,3%, valor que se asemeja a estudios realizados de forma similar a este trabajo. En tres predios se aisló *Salmonella typhimurium* y en el restante se aisló *Salmonella dublin*.

Se concluye que *Salmonella* spp. está presente en las heces de terneros de lecherías de la comuna de Paillaco y que por ende existen fuentes de contaminación dentro de estos predios, constituyendo un factor de riesgo para la población humana y animal, ya que los serotipos encontrados han sido descrito en ambos como agentes causales de enfermedad.

Palabras claves: *Salmonella*, lecherías, heces, terneros, Chile.

2. SUMMARY

“Detection of *Salmonella* spp. in calves feces on dairy farms of over 100 hectare in Paillaco county”

Being one of the most relevant intestinal pathogens within the field of public health, *Salmonella* spp. is the second infectious agent of foodborne diseases in industrialized countries, causing large economic losses. This biological agent is under constant monitoring due to its variable antibiotic resistance. Wild life, farm and domestic animals have been found to be sources of this disease towards humans. Being most common on dairy farms, many approaches to the study of this disease have related to the positive testing of dairy fields through the bacteriological study of feces. The objective of this study was to determine the presence of *Salmonella* spp. in the feces of apparently healthy calves on dairy farms in Paillaco county, and the serological typification of the strains obtained.

Fecal matter samples were obtained from the final portion of the rectum. The individual samples were mixed into separate feces matter pools for each dairy farm. Bacteriological analysis was done by incubating 25 grams of feces at 35° C during 16 to 20 hours in a buffered peptone water broth (BPW). The bacteria thus obtained (0.1 mL) were then grown in a Rappaport-Vassiliadis broth at 42° C for 24 hours. At the same time, 1 mL of the bacteria obtained from the BPW broth were grown in Tetrathionate broth at 35° C for 24 hours. After this incubation period, samples from both broths were plated onto XLD agar and incubating at 35° C for 24 hours. Colonies described as potentially suspicious were submitted for biochemical confirmation and serological typification.

From a total of 28 dairy farms studied, 4 were found positive to *Salmonella* spp. testing. This represents a 14,3% frequency, value which is similar to that obtained in other studies done in a like manner. Out of these 4 positive farms, 3 were found to have *Salmonella typhimurium* and 1 *Salmonella dublin*.

In conclusion, *Salmonella* spp. is present in calves feces on dairy farms in Paillaco county, and it can therefore be said that there are transmission sources on these farms, being a health risk to animals as well as humans, for both of the serotypes found have been described as sources of salmonellosis in humans.

Key words: *Salmonella*, dairy farms, feces, calves, Chile.

3. INTRODUCCION

La obtención, distribución y consumo de alimentos inocuos es un tema que cada día toma mayor importancia dentro de los países desarrollados y en vías de desarrollo. Se ha establecido que en la cadena alimentaria se debe reconocer que todas las etapas que la componen desde la producción, elaboración, comercialización y consumo de productos alimenticios comparten la responsabilidad de suministrar alimentos inocuos y nutritivos. La creciente liberalización del comercio de alimentos y productos agrícolas puede beneficiar tanto a los consumidores como a los productores debido a la mayor variedad de alimentos y productos o a las nuevas oportunidades de obtener ingresos derivados de la exportación. No obstante, las posibles consecuencias negativas de esta tendencia influyen en la posibilidad de que las enfermedades transmitidas por los alimentos se propaguen más fácilmente, e incluso de forma más rápida entre los países, ocasionando riesgos para la salud a los consumidores y riesgos financieros a los productores y elaboradores de alimentos que no cumplan las rigurosas y cada vez más globalizadas normas de inocuidad de los alimentos (FAO 2003).

A consecuencia de los cambios de sistemas de vida y de los hábitos alimentarios, las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados han aumentado a nivel mundial. Se han descrito alrededor de 250 agentes causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales. Se ha estimado que el 66% de los brotes y el 87% de los casos de ETA se deben a agentes bacterianos (Bean y Griffin 1990, Prado y col 2002).

En 1997 se estimó que en Estados Unidos *Salmonella* spp. era la segunda bacteria en importancia en cuanto a enfermedades transmitidas por alimentos (Wallace y col 2000). Datos de este mismo país indican que anualmente se producen 1.400.000 casos de brotes de ETA en los que se asocia a *Salmonella* spp. como agente etiológico de la enfermedad, con aproximadamente 600 muertes, afectando principalmente a niños y ancianos. Además, se estima que se presentan unos 2.800 casos de complicaciones clínicas, debido a la presentación de enfermedad septicémica (Mead y col 1999). Los costos anuales en relación a la presentación de cuadros de salmonelosis en este mismo país se estiman entre US\$ 600.000.000 y US\$ 3.500.000.000 (Murinda y col 2002). Cabe señalar que se considera a la salmonelosis como una enfermedad que afecta a todas las especies animales, incluido el hombre y es causada por varias especies distintas de *Salmonella* (Blood y Radostitis 1992, Acha y Szyfres 2001).

El año 2000 en Santiago de Chile se notificaron 260 brotes de ETA con un total de 1774 personas enfermas y dos muertes. Se identificó a *Salmonella* spp. como principal agente asociado a brotes de ETA, alcanzando el 43,8% de los casos en los que fue posible reconocer al agente causal (Prado y col 2002).

Tanto las ETA como las zoonosis producidas por *Salmonella* spp. han tomado especial importancia en las últimas décadas por la resistencia a antibióticos que han presentado diversas cepas de esta bacteria (Spika y col 1987, Cordado y col 1996, Beach y col 2002). Cruchaga y col (2001) y Zhao y col (2002), señalan que existe una epidemia mundial de resistencia y multiresistencia de *Salmonella* spp. a sustancias antimicrobianas. Es posible que la resistencia observada en *Salmonella* spp., en casos humanos, se deba a una característica adquirida por estas bacterias desde los alimentos de origen animal, ya que estos son muchas veces tratados o mal tratados con antibióticos, además de ser utilizados como promotores de crecimiento (Cohen y Tauxe 1986, Spika y col 1987, Fey y col 2000, Guerra y col 2000, White y col 2001, Beach y col 2002).

Diversos autores señalan los antibióticos a los cuales diferentes cepas de *Salmonella* spp. han presentado resistencia, dentro de los cuales se mencionan: amoxicilina más ácido clavulámico, estreptomina, sulfametazol, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, sulfanamidas y cefalosporinas (Spika y col 1987, Cordado y Virgilio 1996, Dargatz y col 2000, Guerra y col 2000, Fey y col 2000, Bacon y col 2002, Cruchaga y col 2001, Beach y col 2002, Zhao y col 2002, Chen y col, 2004).

Los alimentos comúnmente implicados en brotes de salmonelosis humana (frecuentemente crudos o mal cocidos) son huevos, carnes de aves, bovinos, porcinos y sus derivados, aunque también se describen otros alimentos como helados de crema, vegetales, frutas, hierbas, especias, jugos y leche con procesos de pasteurización inadecuados. Cabe considerar los animales son señalados como reservorio de *Salmonella* spp. (Bean y Griffin 1990, Pell 1997, Fey y col 2000, White y col 2001, Jawetz y col 2002, Gil-Setas y col 2002, Sanchez y col 2002, Sorensen y col 2002).

En cuanto a la enfermedad, se describe que la bacteria ingresa vía oral al organismo, invade la pared intestinal en ileon y ciego, pudiendo alcanzar los ganglios linfáticos mesentéricos. *Salmonella* spp. puede establecerse en las células reticuloendoteliales del hígado desde donde eventualmente podría invadir la corriente sanguínea (Blood y Radostitis 1992). La enfermedad puede presentarse de tres formas; septicémica, enteritis aguda o enteritis crónica. La presentación de una de estas formas va a depender del estado inmune del huésped, la edad de éste, la cantidad del inóculo, la virulencia de la cepa y la exposición del huésped al estrés (Blood y Radostitis 1992, Acha y Szyfres 2001). El cuadro clínico en humanos provoca una enterocolitis que se acompaña de vómitos, náuseas, fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y abdominal, además de producirse deshidratación del paciente. La salmonelosis entérica típica se recupera en alrededor de 5 a 7 días sin requerir tratamiento antibiótico. Se estima que entre el 3 a 10% de los casos clínicos desarrollan bacteremia, sucediendo esto en grupos de ancianos, niños o personas inmunodeprimidas, en donde el tratamiento con sustancias antimicrobianas se hace esencial (Acha y Szyfres 2001, White y col 2001). La infección en los animales domésticos se caracteriza por producir fiebre, diarrea (que puede ser intermitente), deshidratación, emaciación y en algunos casos abortos. En terneros es posible observar neumonía, osteomielitis o poliartritis junto o separadamente a signología nerviosa (Blood y Radostitis 1992, Acha y Szyfres 2001, Libby y col 2004).

Los animales al ser infectados por *Salmonella* spp. pueden presentar la enfermedad clínica pudiendo, además, convertirse en portadores activos que eliminarán intermitentemente los microorganismos a través de la materia fecal. Otra posibilidad es que se conviertan en portadores latentes en donde existe una infección persistente de nódulos linfáticos y tonsilas, en cuyo caso no hay eliminación fecal de la bacteria, la cual eventualmente puede desencadenarse por situaciones de estrés. Una última posibilidad es la de los llamados portadores pasivos, los cuales son animales que constantemente adquieren *Salmonella* spp. desde del ambiente pero no sufren invasión (Richardson 1975, Wray y Sojka 1977, Sanchez y col 2002). La infección persistente, que resulta en los diferentes estados de animales portadores, se debe a que *Salmonella* spp. es un microorganismo intracelular facultativo, razón por la cual puede sobrevivir dentro los fagolisosomas de células macrófagas, pudiendo de esta forma, evadir la acción bactericida de los anticuerpos y de la cascada del complemento (Smith y col 1989, Spier y col 1990, Sanchez y col 2002).

En el ganado bovino es más frecuente que la enfermedad se presente clínicamente en terneros, afectándolos hasta las doce semanas de edad, siendo lo habitual que se presente en animales de una semana hasta seis semanas. En animales adultos es menos común que suceda el cuadro clínico, aunque es mayor la probabilidad de que queden como portadores de *Salmonella* spp. (Webster 1984, Smith y col 1989, Blood y Radostitis 1992, Hirsch 1994, Sanchez y col 2002).

Bovinos adultos, portadores latentes de *Salmonella* spp. en situaciones de estrés, como por ejemplo el parto, pueden convertirse en portadores activos, eliminando así el patógeno al medio ambiente, pudiendo de esta forma infectar a los terneros, ya sea por contaminación oro-fecal, ingestión de calostro o por alimentar a los recién nacidos con leche de desecho en el caso de lecherías. Las explotaciones lecheras se describen en la literatura como las más frecuentemente afectadas por la bacteria (Blood y Radostitis 1992, Hirsch 1994, Stabel y col 2004). Por otro lado es importante señalar los largos períodos de eliminación de *Salmonella* spp. por parte de animales asintomáticos y convalecientes, los cuales garantizan la distribución de la bacteria en el medio ambiente, cuya supervivencia se ha reportado puede alcanzar varios meses, lo cual hace posible la infección de los terneros y animales adultos, manteniendo una infección crónica del rebaño con *Salmonella* spp. (Webster 1984, McLaren y Wray 1991).

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, corresponden a bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles por flagelos peritricos a excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* que son siempre inmóviles. Metabolizan nutrientes a través de las vías respiratorias y fermentativas. Características del género son ser bacterias oxidasa negativo y catalasa positivo. Además producen ácido y gas desde la glucosa, manitol, maltosa y sorbitol, pero no desde lactosa ni sacarosa, aunque se ha informado que algunas cepas son capaces de utilizar estos azúcares. Generalmente producen hidrógeno sulfurado (H₂S). La reacción a la prueba de indol es negativa como también la hidrólisis de la urea (Le Minor 1984, D'Aoust 1997). En cuanto a los factores de crecimiento, la temperatura óptima es de 37 °C, son bacterias psicotróficas, presentando habilidad para crecer entre temperaturas de 2-4 °C hasta temperaturas menores o iguales a 54 °C. *Salmonella* spp. soporta rangos de pH entre 4,5 y 9,5, siendo el rango óptimo entre 6,5 y 7,5. En cuanto a la actividad

de agua (a_w) no son capaces de crecer en valores iguales o menores a 0,93 y concentraciones de 3-4% de cloruro de sodio (NaCl) generalmente inhiben su crecimiento, aunque estas concentraciones pueden ser soportadas si la temperatura varía entre 10-30 °C (D'Aoust 1997). *Salmonella* spp. es resistente a ciertas sustancias químicas como el verde brillante, tetrionato de sodio y desoxicolato sódico. Estos compuestos inhiben otras bacterias entéricas, por lo tanto es útil incluirlos en los medios de cultivo selectivos utilizados para aislar *Salmonella* spp. desde diferentes muestras incluido el material fecal (Jawetz y col 2002).

Tradicionalmente se divide al grupo *Salmonella* en tres categorías basado en su predilección de huésped: especies adaptadas a humanos, las adaptadas a animales y las que no tienen predilección de huésped (Nabbut 1993, Acha y Szyfres 2001). Actualmente se describen 2463 serotipos del género *Salmonella* (Libby y col 2004). Las especies adaptadas a humanos corresponden a *Salmonella typhi* y *paratyphi* A y C. Los serotipos que afecten a los animales van a depender de la especie animal que se trate; así para bovinos se indica como común a *Salmonella dublin*, para cerdos *Salmonella choleraesuis*, en aves *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*, en equinos *Salmonella abortusequi*, en ovejas *Salmonella abortusovis* y *Salmonella arizona* en el caso de los reptiles. Las especies sin preferencia particular de huésped corresponden a la mayoría de las serovariedades de *Salmonella* spp., afectando tanto al hombre como a los animales. La infección por cepas diferentes a las comúnmente descritas para huéspedes animales podría suceder por el consumo de alimentos contaminados especialmente harina de carne y hueso y harina de pescado subesterilizados. Además se describe el rol de vectores como ratas o aves silvestres en la diseminación de *Salmonella* spp. hacia los animales de granja. En tanto el hombre, se puede infectar por especies diferentes a las adaptadas a él, por el consumo de alimentos contaminados o por contaminación oro-fecal, producida desde animales portadores de *Salmonella* spp. (OMS 1988, Blood y Radostitis 1992, Acha y Szyfres 2001, Libby y col 2004).

Entre las especies de *Salmonella* spp. sin predilección de huésped que han sido aisladas desde animales, destacan *Salmonella entitidis* desde aves y desde bovinos se ha aislado *Salmonella hadar*, *Salmonella panama*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella cerro*, *Salmonella dublin* y especialmente *Salmonella typhimurium*, la cuál también se ha aislado desde otros animales domésticos como: pollos, cerdos, ovinos, caninos, felinos y desde animales de vida silvestre como aves, roedores y zorros (Spika y col 1987, Cordado y Virgilio 1996, Dargatz y col 2000, Guerra y col 2000, Fey y col 2000, Cruchaga y col 2001, Bacon y col 2002, Beach y col 2002, Sanchez y col 2002, Zhao y col 2002, Castillo 2004).

Se han realizado diversos estudios para establecer la frecuencia de presentación de *Salmonella* spp. en animales de consumo humano. Para ello se han analizado bacteriológicamente piel, músculo y material fecal, a fin de asociar la presencia de la bacteria en animales y la posibilidad de que estas lleguen a producir enfermedad en humanos. Los resultados han sido diversos para los diferentes investigadores, indicando porcentajes de muestras de heces positivas en bovinos adultos y rebaños en los Estados Unidos que fluctúan entre un 0 a un 38% (Gay y col 1994, Fedorka-Cray y col 1998, Dargatz y col 2000, Beach y col 2002, Sorensen y col 2002). Para establecer porcentajes de rebaños y animales infectados con *Salmonella* spp. también se ha analizado material fecal de terneros, obteniendo resultados

de un 0 a un 16% cuando se trata de rebaños. En cuanto al número de animales positivos este ha variado de un 0 a un 8% en estudios realizados en Estados Unidos (Pacer y col 1989, Corrier y col 1990, Lance y col 1992, Losinger y col 1995). Es necesario considerar, al margen de estos resultados, que no todas las especies aisladas desde estos animales son causantes de enfermedad en humanos, así Sorensen y col (2002) estiman que un 4,8% de las cepas aisladas corresponden a las mismas asociadas a enfermedad en el hombre. Por su parte, Fedorka-Cray y col (1998), de 20 serotipos aislados desde humanos y animales con signos clínicos de salmonelosis reconocieron a tres cepas concordantes entre ambos, éstas fueron *Salmonella typhimurium*, *Salmonella newport* y *Salmonella montevideo*.

El análisis bacteriológico de un elevado número de muestras de origen alimentario o clínico, puede resultar en un alto costo económico y cuantioso trabajo de laboratorio. Una forma de disminuir estos factores, es la utilización de un sistema de “pool” (mezcla de unidades de una población muestral), lo cual consiste en tomar iguales cantidades de muestras de las diferentes unidades en estudio, para luego depositarlas en un mismo contenedor, en donde deben ser homogenizadas rigurosamente. Subsecuentemente, se toma una submuestra del homogenizado, la cual será sometida al análisis de laboratorio y representará a cada unidad incluida en el “pool”. De esta forma se obtienen resultados fidedignos tanto positivos como negativos en la detección de *Salmonella* spp. disminuyendo el costo económico y el trabajo de laboratorio (ICMSF 1981, Terragno y col 2003).

Terragno y col (2003), indican que debido a la baja cantidad de *Salmonella* spp. que se puede encontrar presente en las heces de animales sin signos evidentes de la enfermedad, es útil considerar este tipo de muestra como si fueran de origen alimentario. El manual BAM *online* (FDA 2003), indica las técnicas de laboratorio para el análisis de muestras de alimentos en la detección de *Salmonella* spp. que incluyen una serie de procedimientos, los cuales consisten en incubar las muestras por un tiempo determinado en caldos de enriquecimiento no selectivo, a fin de dar la posibilidad a las bacterias dañadas o debilitadas de recuperarse y multiplicarse. A continuación, se debe someter la muestra a un enriquecimiento selectivo, para de esta forma favorecer el desarrollo de *Salmonella* spp. e inhibir el crecimiento de la flora microbiana acompañante. Posteriormente, se realiza una siembra en medios sólidos selectivos y diferenciales para poder así reconocer las colonias de la bacteria, además de inhibir el crecimiento de otras especies. Para identificar las cepas de *Salmonella* spp. se procede a efectuar pruebas bioquímicas confirmativas. También se utiliza serología para determinar el serotipo presente. Desde el inicio de los análisis hasta obtener resultados pueden transcurrir entre 6 y 7 días.

En cuanto al enriquecimiento no selectivo, para la detección de *Salmonella* spp., se ha utilizado comúnmente el Agua Peptonada Tamponada (APT) y el Caldo Lactosa (CL). En tanto al enriquecimiento selectivo clásicamente se han utilizado los caldos Rappaport-Vasiliadis (RV), Selenito-Cistina (SC) y Tetrionato (TT). Los medios sólidos selectivos y diferenciales comúnmente utilizados son el agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y el agar *Salmonella-Shigella* (SS). Estos materiales han sido utilizados en diferentes estudios en los que se han analizado tanto muestras de alimentos como también muestras clínicas

provenientes desde humanos y animales (D'Aoust 1981, Gallego y col 2000, Hammack y col 2001, Murinda y col 2002, FDA 2003, Castillo 2004).

Para el aislamiento de *Salmonella* spp. desde material fecal de bovinos se han propuesto diversas técnicas. La cantidad de muestra analizada ha variado entre 1 a 100 gramos en diferentes estudios. Los caldos de enriquecimiento selectivo han sido TT, RV y SC. Los tiempos de incubación que se describen varían de 24 a 48 horas y la temperatura de incubación comúnmente señalada son 37°C. Los medios de cultivo sólidos diferenciales empleados han sido agar Xilosa Lisina Tergitol (XLT4), agar Sulfito de Bismuto (BGS), agar XLD y agar SS, incubados a 37 °C por un tiempo aproximado de 24 horas. Posteriormente las colonias sospechosas se someten a pruebas bioquímicas y serológicas para su completa identificación (Fedorka-Cray y col 1998, Wells y col 2001, Huston y col 2002, Castillo 2004).

Considerando la importancia que puede llegar a tener *Salmonella* spp. dentro del área de salud pública y clínica veterinaria, este trabajo pretende obtener información sobre la presencia de este patógeno en predios lecheros, ya que además de leche producen animales para la industria cárnica (Stabel y col 2004). Se determinará la presencia del patógeno por medio del análisis de muestras fecales de terneros de temprana edad, por ser éstos susceptibles de contraer *Salmonella* spp. de posibles portadores adultos sanos o de otras fuentes de contaminación tanto fuera como dentro del mismo predio.

En la décima región se concentra la mayor cantidad de bovinos y de vacas lecheras, alcanzando respectivamente el 38,7% y el 61,5% de la masa total del país. Es por esta razón que la región de Los Lagos es el lugar indicado para realizar este estudio. Dentro de la región, la provincia de Valdivia, posee la mayor masa de bovinos alcanzando el 37,2% del total regional. Dentro de esta provincia, la comuna de Paillaco, posee el 63,6% de vacas y el 74,9% de terneros en predios mayores a 100 hectáreas (INE 1998), motivo por el cual se eligió a los predios con estas características para incluirlos en este trabajo. Cabe señalar que en Chile existe un consumo de carne de bovino de 23,6 kg por habitante/año y que dentro del beneficio anual de ganado bovino la categoría vacas es la segunda en importancia alcanzando el 21% de los beneficios nacionales anuales (INE 2004). Se hace entonces necesario obtener información sobre la presencia de *Salmonella* spp. en los animales de abasto debido a la probabilidad de ingreso de este trascendente patógeno a la cadena alimentaria.

De acuerdo a los antecedentes señalados se plantea la hipótesis que “*Salmonella* spp. está presente en predios lecheros de la comuna de Paillaco”. Para probar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la frecuencia de predios lecheros positivos a *Salmonella* spp. y los serotipos presentes en ellos.
- Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en predios lecheros, mediante el análisis bacteriológico de material fecal de terneros.
- Identificar los serotipos predominantes de *Salmonella* spp. en material fecal de terneros de lecherías.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 MATERIAL

El acceso a los predios a muestrear se obtuvo junto al personal del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la comuna de Paillaco, quienes periódicamente visitan 53 predios lecheros mayores a 100 hectáreas que están inscritos en el programa de erradicación de Brucelosis bovina (*). Fue así, que en el período mayo-agosto del año 2004, se logró muestrear terneros en 28 predios lecheros con una única visita a cada uno de ellos. En cada predio, individualizado con un número correlativo, se aplicó un cuestionario al personal disponible, en el que se consideraron los siguientes datos: nombre del propietario y del predio, tamaño de éste y el número terneros mayores a una semana y menores a tres meses de edad que estuvieran estabulados. Las muestras de material fecal se tomaron de terneros que estuvieran aparentemente sanos, estabulados y en el rango de edad antes señalado. Conforme al número de animales con estas características, la factibilidad de apoyo del personal auxiliar, la disponibilidad de tiempo de permanencia en cada predio y la factibilidad fisiológica de obtener el material fecal, se logró un diferente número de muestras en cada lugar visitado.

4.2 MÉTODO

El material fecal se obtuvo desde la última porción del intestino grueso mediante palpación rectal utilizando guantes de examen clínico. Se obtuvieron aproximadamente 25 gramos de material fecal de cada animal, lo que fue depositado en una bolsa plástica para obtener un pool de muestras de cada predio. Después de homogenizar las heces del pool, se extrajeron aproximadamente 50 gramos del homogenizado, que fueron depositados en un frasco de vidrio estéril debidamente rotulado. Los frascos fueron transportados en refrigeración al Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, donde se realizó el análisis bacteriológico, utilizando 25 gramos del homogenizado, el análisis se comenzó el mismo día del muestreo. La técnica utilizada se diseñó a partir de publicaciones de los autores Murinda y col (2002), FDA (2003) y Terragno y col (2003). El esquema de la técnica utilizada se señala en la figura N° 1.

* Comunicación personal: Dra Cristina Ramírez, M.V., SAG oficina Paillaco.

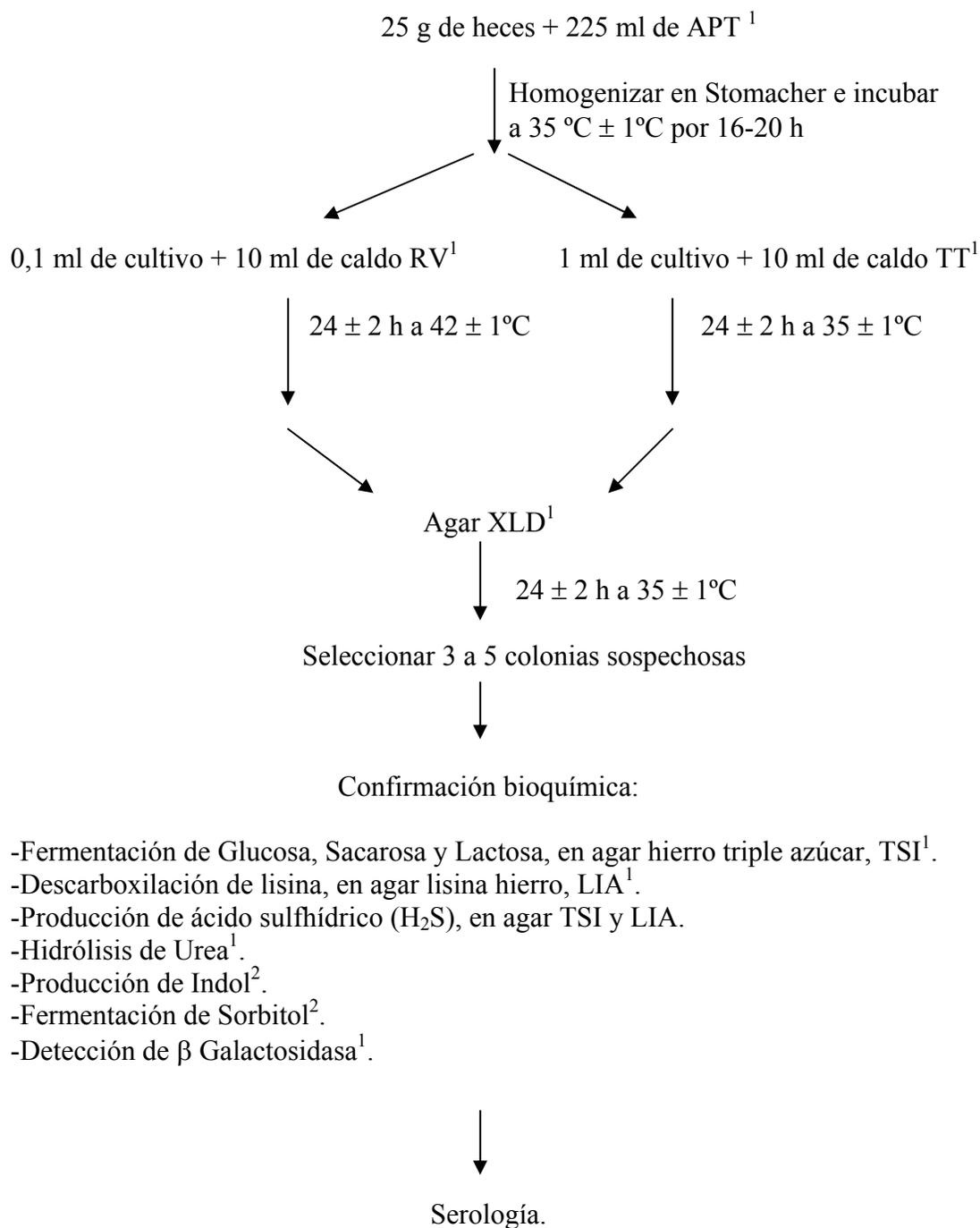


FIGURA N° 1: Técnica para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. a partir de material fecal de terneros.

¹Laboratorio Oxoid.

²Preparado según NCh 2675 Of 2002.

De acuerdo a lo señalado por Holt y col (2000) y Jawets y col (2002) la clave que se utilizó para el reconocimiento de *Salmonella* spp. fue la siguiente:

Fermentación de Glucosa	(+)	Fermentación de Sacarosa	(-)
Producción de Indol	(-)	Fermentación de Lactosa	(-)
Producción de H ₂ S	(+) ó (-)	Descarboxilación de Lisina	(+)
Hidrólisis de Urea	(-)	Fermentación de Sorbitol	(+)
Producción de β Galactosidasa	(-)		

Las cepas que resultaron positivas a las pruebas bioquímicas y que por lo tanto pertenecían al género *Salmonella*, fueron enviadas al Instituto de Salud Pública de Chile para su tipificación serológica.

4.3 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS.

De acuerdo a la información obtenida se confeccionaron cuadros en donde se señala el número de predios muestreados, número y porcentaje de terneros muestreados en cada predio y los serotipos aislados de *Salmonella* spp. en cada uno de ellos.

En base al programa computacional EPIINFO 2002 se calculó la representatividad del tamaño muestral obtenido. Para evaluar el número de predios incluidos en el estudio se utilizó el subprograma STATCALC SURVE SAMPLING. Para evaluar el número de muestras incluidas en cada pool se utilizó el mismo subprograma y posteriormente el resultado fue sometido a la fórmula de afijación* (Kisch, 1972), para de esta forma obtener un reparto de la muestra entre los predios en forma proporcional. Para evaluar el resultado de predios positivos se recurrió el programa computacional EPIDAT 3.0 del cual se utilizó el subprograma DOCIMA Z PARA UNA PROPORCIÓN.

*Fórmula de afijación (Kisch 1972) : n / N

En donde:

n = Tamaño de la muestra.

N = Tamaño de la población.

5. RESULTADOS

Considerando las limitaciones prácticas para realizar el muestreo destinado a la determinación de predios positivos a *Salmonella* spp. en la comuna de Paillaco, se realizó posteriormente una evaluación estadística de la representatividad del material muestreado a fin de apreciar su validez.

5.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL MUESTREADO.

En el cuadro N° 1 se dan a conocer las características asociadas al muestreo de terneros aparentemente sanos, estabulados y mayores a una semana y menores de tres meses de edad, existentes en cada predio estudiado.

5.1.1 Número de predios muestreados.

De acuerdo al punto 4.3, utilizando un tamaño poblacional (N) de 53 predios lecheros mayores a 100 hectáreas, una frecuencia esperada de predios positivos a *Salmonella* spp. de un 4%, un nivel de confianza (z) de 95% y una precisión esperada (d) de un 5%, se obtuvo un valor $n = 28$, cifra que coincide con el número de predios muestreados en este trabajo (Cuadro N° 1).

5.1.2 Número de animales muestreados en cada predio.

De acuerdo al punto 4.3, para determinar este valor se consideró un $N = 1371$ (cuadro N° 1), una frecuencia esperada de 4% de animales positivos a *Salmonella* spp., un nivel de confianza (z) = 95% y una precisión esperada (d) = 5%. Después de realizar una afijación del tamaño muestral (Kisch 1972), para distribuir en forma proporcional la muestra, se obtuvo que como mínimo se debe incluir en el estudio el 4,1% de los terneros existentes en cada predio con las características consideradas en este trabajo (animales aparentemente sanos, estabulados y en el rango de edad señalado). Al cotejar el valor n estimado de 4,1% con los porcentajes de terneros que conformaron parte de los pool de material fecal analizado, se deduce que el número de terneros muestreados en cada predio fue siempre superior al mínimo estimado, puesto que fluctuó entre los valores 12,5 y 100% (cuadro N° 1).

CUADRO N° 1.

Número (N°) y porcentaje (%) de terneros muestreados en cada predio lechero mayor a 100 hectáreas de la comuna de Paillaco.

N° de predio.	N° de Terneros con las características incluidas en este estudio.	N° de terneros muestreados en cada predio.	Porcentaje de terneros muestreados (%).
1	13	5	38,46
2	32	8	25
3	55	9	16,36
4	81	13	16,05
5	9	3	33,33
6	32	7	21,88
7	16	7	43,75
8	168	23	13,7
9	4	4	100
10	72	17	23,61
11	102	16	15,69
12	15	7	46,67
13	12	7	58,33
14	102	18	17,65
15	39	15	38,46
16	49	18	36,73
17	80	10	12,50
18	22	12	54,55
19	22	13	59,09
20	78	14	17,95
21	30	17	56,67
22	238	36	15,13
23	10	7	70
24	16	11	68,75
25	17	11	64,71
26	23	14	60,87
27	27	17	62,96
28	6	4	66,67
Total	1371	344	25,09

5.2 AISLAMIENTO DE *Salmonella* spp.

De los 28 predios sometidos a estudio, 4 resultaron con presencia de *Salmonella* spp. en el material fecal de sus terneros, lo cual corresponde a un 14,3% de predios positivos a la bacteria. Al someter este valor a prueba estadística “docima de z para una proporción” (punto 4.3), resulta $p = 0,0000$, con lo cual queda manifiesto que el porcentaje de predios positivos obtenidos en este estudio no es producto del azar.

5.3 SEROTIPIFICACIÓN DE *Salmonella* spp.

En el cuadro N° 2, se entrega el detalle del número de aislamientos de *Salmonella* spp. y el resultado de la serotipificación respectiva por pool de material fecal, correspondiente a cada predio positivo a la bacteria. De acuerdo a la figura N° 1, se seleccionaron de 3 a 5 colonias sospechosas de ser *Salmonella* spp., las cuales se sometieron a confirmación bioquímica. Las colonias de cada pool que correspondieron al género *Salmonella* fueron posteriormente serotipificadas.

CUADRO N° 2

Aislamientos de *Salmonella* spp. en los predios positivos y resultado de la serotipificación de las cepas obtenidas.

Predios positivos.	Cantidad de aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella typhimurium</i> .	<i>Salmonella dublin</i> .
N° 8	2	-	2
N° 10	1	1	-
N° 12	3	3	-
N° 20	5	5	-
Total	11	9	2

Independiente del número de cepas que resultaron ser *Salmonella* spp. tras la confirmación bioquímica de las mismas, al ver el resultado de la serotipificación, destaca que siempre se aisló una única especie de la bacteria en cada pool analizado. De esta forma en tres predios se aisló *Salmonella typhimurium* y solamente en un predio se aisló *Salmonella dublin*.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que de los predios lecheros mayores a 100 hectáreas de la comuna de Paillaco, un 14,3% presentan resultados positivos en la detección de *Salmonella* spp., según muestras fecales analizadas de terneros. Este dato se asemeja a otros resultados obtenidos en diferentes estudios realizados en Estados Unidos, en los que se han utilizado heces de terneros de lecherías para determinar la presentación predial de *Salmonella* spp. Es así, como Pacer y col (1989), detectaron un 16% de predios lecheros positivos a *Salmonella* spp., incluyendo además en su estudio muestras de animales adultos. Por su parte, Corrier y col (1990), en un estudio en el cual incluyeron granjas de diferentes estados, obtuvieron valores entre un 0 y 8% de predios positivos a *Salmonella* spp. A su vez, Lance y col (1992), lograron identificar un 14,9% de predios positivos a la bacteria, mientras que Fossler y col (2004), obtuvieron como mínimo un 6,4% y un máximo de un 92,7% de predios lecheros positivos a *Salmonella* spp.

Una importante característica de *Salmonella* spp. es la excreción fecal de la bacteria por parte de los animales portadores. Esta resulta ser intermitente y está ligada principalmente a condiciones de estrés, razón por la cual no es posible determinar cuando la bacteria podría ser eliminada en la materia fecal (Wray 1985, Corrier y col 1990, Gay y col 1994). También, se debe considerar el origen de las muestras que se incluyan en los estudios, las cuales, además de muestras fecales de terneros pueden incluir muestras fecales de animales adultos, muestras provenientes desde los alimentos, el ambiente y de predios que posean o no historia clínica de salmonelosis, lo cual influirá en un mayor o menor número de predios positivos a *Salmonella* spp. Es así como en el Reino Unido, en donde la salmonelosis es considerada como endémica, Wray y col (1987), obtuvieron un 81,8% de predios positivos a la bacteria, el estudio fue realizado tomando muestras de material fecal tres veces cada semana por un período de 4 semanas. El estudio realizado por Pacer y col (1989), incluyó muestras provenientes desde animales adultos y de terneros que en su mayoría presentaban diarrea, obteniendo un 16% de predios positivos. Corrier y col (1990), estudiaron predios sin historial de salmonelosis, obtuvieron valores entre 0 y 8% de predios positivos a la bacteria. Como se ha señalado, Lance y col (1992), obtuvieron un 14,9% de predios positivos a *Salmonella* spp. En su estudio muestrearon predios, sin historial de salmonelosis, al menos dos veces en el período de un año. Fossler y col (2004), consideraron en su estudio muestras fecales de terneros y animales adultos, además incluyeron muestras de estanques de leche, agua, alimento y del ambiente (corrales). Realizaron el muestreo cada dos meses por el período de un año, aislando de esta forma *Salmonella* spp. en el 92,7% de las lecherías. Cabe considerar que de muestras fecales y en una sola visita obtuvieron muestras positivas del 6,4% de los rebaños. De esta forma, queda manifiesto las múltiples variables que influyen en la detección de predios positivos a *Salmonella* spp. Es entonces válido señalar que, al considerar la obtención de muestras sólo de origen fecal, se debe tomar en cuenta que el muestreo en forma secuencial aumenta las probabilidades de encontrar la bacteria, debido a la intermitencia en que ésta es eliminada por

parte de los animales portadores. Por lo tanto, es recomendable realizar más de una visita a los predios que se incluyan en estudios de frecuencia de presentación de *Salmonella* spp.

En el caso de este estudio, el hecho de no encontrar muestras positivas en la mayoría de los rebaños, no indica que éstos estén libres de *Salmonella* spp., ya que como anteriormente se ha señalado la excreción de esta bacteria por parte de animales es intermitente, por lo tanto con una sola visita no es posible afirmar que los animales o el predio estén libres del patógeno (Corrier y col 1990, Losinger y col 1995). En base a esto, puede afirmarse que, los predios que resultaron negativos en este estudio no necesariamente están libres de *Salmonella* spp.

Otro factor a considerar en la eliminación de *Salmonella* spp. en material fecal de bovinos es la época del año, de esta forma se señala que es más frecuente recobrar la bacteria en meses de primavera-verano que en meses de otoño-invierno (Van Donkersgoed y col 1999, Dargatz y col 2000, Wells y col 2001). El presente estudio se realizó en meses de otoño-invierno, por lo tanto, es probable que los resultados positivos sean mayores si el estudio se realizara en primavera-verano.

Al identificar la presencia de *Salmonella* spp. en heces de terneros de lecherías, se puede concluir que en dichos predios existen fuentes de contaminación, las cuales pueden afectar a diferentes grupos etarios del rebaño. En cuanto a las fuentes de contaminación en los rebaños, éstas pueden dividirse en internas o externas a los predios. Las fuentes de contaminación externas pueden provenir de aves y roedores de vida silvestre, quienes pueden contaminar los alimentos con sus heces. Además se señala el rol del agua contaminada con la bacteria y de alimentos subesterilizados como por ejemplo: harina de pescado y harina de carne y hueso, las cuales eventualmente pueden ser incluidas en la formulación de raciones alimenticias para estos animales (Blood y Radostitis 1992).

En cuanto a las fuentes internas de contaminación, se señala que vacas portadoras de *Salmonella* spp. pueden eliminar la bacteria en condiciones de estrés, como por ejemplo después del parto, a través de la leche, calostro, materia fecal e incluso en secreciones vaginales (Osborne y col 1977, Martin y Smith 1985, Sanchez y col 2002, Stabel y col 2004). De esta forma se contaminaría en gran medida el medio ambiente, además de existir la probabilidad de infectar a los terneros, quienes distribuirían a su vez al patógeno contaminando aún más el predio con *Salmonella* spp., manteniendo la bacteria entre diferentes animales, el alimento y el ambiente (Martin y Smith 1985, Anderson y col 2001). Peek y col (2004), sugieren que los bovinos adultos son los mayores contaminadores del ambiente con este patógeno. McLaren y Wray (1991) recobraron *Salmonella* spp. del medio ambiente hasta 14 meses después de despoblar rebaños que presentaron brotes de salmonelosis, concluyendo que la bacteria es capaz de sobrevivir por largos períodos en el medio ambiente manteniendo así focos de infección dentro de un predio. Otra forma mediante la cual se puede diseminar *Salmonella* spp. dentro un rebaño, es a través de las prácticas de esparcimiento de heces sobre las praderas con el fin de otorgar abono a la tierra. Es así como el patógeno puede contaminar el suelo y los vegetales pudiendo infectar a animales susceptibles dentro del rebaño (Islam y col 2004). Es entonces válido señalar que, basta que un animal se infecte con la bacteria para que se produzca la diseminación de ésta dentro del rebaño, mediante la eliminación fecal de

Salmonella spp. Desde este punto de vista se puede afirmar que los predios en los que se encontró la bacteria en el material fecal de sus terneros, pueden haber adquirido el patógeno tanto de fuentes internas o externas al predio, aún así el hecho de aislar bacteria nos indica que esta está presente en los predios.

Desde el punto de vista de salud pública, los predios en los que existe *Salmonella* spp. son de probable riesgo para la población humana, pues al existir la posibilidad de que este patógeno se encuentre en el material fecal de los animales y en sus nódulos linfáticos, como en el caso de portadores latentes, existe también la posibilidad que la bacteria llegue a contaminar las canales en la faena de matanza, ingresando de esta forma a otro eslabón de la cadena alimentaria (Spika y col 1987, OMS 1988, McEvoy y col 2003, Stabel y col 2004). Diversos autores han reportado el hallazgo de *Salmonella* spp. en material fecal de animales que llegan a plantas faenadoras (Van Donkersgoed y col 1999, Dargatz y col 2000, Castillo 2004), corroborando la posibilidad de contaminar las canales en la línea de matanza. Además, se señala que al realizar cortes de nódulos linfáticos en la inspección médico veterinaria post-mortem, se puede diseminar *Salmonella* spp. en la misma canal o hacia otras, mediante la utilización de cuchillos, lo cual puede suceder en caso que esos nódulos linfáticos correspondan a animales portadores (OMS 1988). Por otro lado, se ha reportado que condiciones de estrés en el traslado de animales a matadero desencadenan eliminación fecal de *Salmonella* spp., la cual es más probable de suceder cuando aumentan las distancias que recorren los animales para ser faenados, pues esto aumenta el estrés (Dargatz y col 2000, Barham y col 2002, Castillo 2004). Por su parte la OMS (1988), indica como factor importante en la propagación de *Salmonella* spp. el traslado de animales por vías nacionales e internacionales. Es entonces ésta una importante forma de cómo el patógeno podría diseminarse desde los predios contaminados hacia otros lugares, otros animales y hacia la población humana.

El Codex Alimentarius (2002) señala, que la producción primaria de alimentos, debe realizarse de manera que se asegure que el alimento sea inocuo y apto para el consumo. Se debe evitar la producción, en donde el medio ambiente represente una amenaza para la inocuidad, además se deben controlar los contaminantes, las plagas y las enfermedades de los animales y plantas, de manera que no representen una amenaza para la inocuidad alimentaria. Todo esto, en el fundamento de reducir la probabilidad de que se origine un peligro que pueda menoscabar la inocuidad de los alimentos, para etapas posteriores de la cadena alimentaria. Estos principios podrían no cumplirse en los predios en los que se aisló *Salmonella* spp. Murinda y col (2002), señalan la importancia de controlar patógenos como *Salmonella* spp. comenzando desde las granjas en que se producen los alimentos, por ser éstas las unidades primarias de producción. Por su parte, Anderson y col (2001), señalan que para disminuir o evitar la contaminación de productos alimenticios, como carne y leche con patógenos que provienen de los animales de granja, es necesaria la implementación de planes de HACCP dentro de los predios que producen estos alimentos. En el caso de agentes biológicos, es necesario identificar las fuentes de contaminación y características epidemiológicas de los mismos para poder implementar un plan HACCP. Estas consideraciones podrían ser útiles para controlar la presentación de *Salmonella* spp. en los predios que resultaron positivos a la

bacteria y también en los que resultaron negativos, a fin de evitar la introducción del patógeno en estos rebaños.

En este trabajo, queda de manifiesto que *Salmonella* spp. existe en los animales de granja en la comuna de Paillaco. Por su parte, Castillo (2004), identificó animales positivos a *Salmonella* spp. en una planta faenadora de carnes, los cuales provenían de las provincias de Valdivia, Osorno, Llanquihue y Coyhaique. Con estos datos es posible afirmar que la bacteria está distribuida en diferentes zonas geográficas del sur de Chile. Esta información puede ser útil en la identificación de predios positivos a la bacteria para formular medidas de control que en el futuro pudieran nacer en base a los tratados de libre comercio que contrae Chile con diferentes países.

En cuanto a los serotipos de *Salmonella* spp. aislados en cada predio, éstos correspondieron a *Salmonella dublin* y *Salmonella typhimurium*. En cada predio positivo, se aisló un serotipo (cuadro N° 2). Estos resultados concuerdan con diferentes estudios en los cuales *Salmonella dublin* y *Salmonella typhimurium* han sido comúnmente aislados desde material fecal de bovinos tanto de terneros como de animales adultos (Osborne y col 1977, Pacer y col 1989, Lance y col 1992, Nabbut 1993, Pacer y col 1992, McEvoy y col 2003).

Salmonella dublin, se señala en la literatura como una bacteria de hábitat restringido, existiendo zonas geográficas en las cuales es considerada como un patógeno endémico. Posee una alta adaptabilidad de huésped, afectando principalmente a bovinos, con cuadros clínicos que son más frecuentes y complicados en animales jóvenes, en los cuales puede producir desde alteraciones limitadas al tracto digestivo hasta bacteremias. En bovinos adultos, puede producir cuadros entéricos, mastitis y abortos en el último trimestre de la gestación, siendo común el desarrollo de animales portadores de la bacteria (Wray y Sojka 1977, Woolcolck 1984, Robinson y col 1985, Wray 1985). A pesar de la adaptabilidad de huésped señalada, *Salmonella dublin* también ha sido aislada, pero en baja cantidad, desde ovejas, cabras, cerdos, caballos y animales de compañía, sugiriendo estrecho contacto de estos animales con ganado bovino (Robinson y col 1985, Liebana y col 2002). Las fuentes de infección de *Salmonella dublin*, dentro de un rebaño, son los animales en el estado de portador, por ejemplo, las hembras bovinas adultas, portadoras de la bacteria, son fuente directa de infección para los terneros, ya que a través de las heces, de la leche y el calostro son capaces de eliminar al patógeno, situación que se exagera en casos de estrés. También se describe que ambientes con alta carga de contaminación bacteriana, pueden ser fuente de infección para animales susceptibles dentro del rebaño (Osborne y col 1977, Martin y Smith 1985, Wray 1985, Spier y col 1990, Nielsen y col 2004). Este patógeno, como causante de ETA, no está muy frecuentemente descrito en la literatura, lo cual puede deberse a su alta especificidad hacia el ganado bovino y su distribución sólo en ciertas áreas geográficas, aunque existen algunos reportes de brotes en humanos en los que se ha involucrado leche sin pasteurizar, subproductos lácteos y carnes (Wray y Sojka 1977, Robinson y col 1985, Wray 1985, Liebana y col 2002). Cabe señalar que también en Chile, *Salmonella dublin*, ha sido aislada desde muestras clínicas de pacientes humanos (Heitmann y col 1999). Es entonces relevante la importancia de *Salmonella dublin* desde el punto de vista de la clínica veterinaria y además por su posible implicancia en brotes de salmonelosis humanas. En cuanto a la prevención de

infecciones debidas a *Salmonella dublin*, se señala la identificación de animales positivos mediante serología, para su posterior eliminación de los predios, debido a la ya mencionada especificidad de huésped que posee la bacteria. Por otro lado la cuarentena de animales comprados también ha sido sugerida, ya que la venta de animales portadores de *Salmonella dublin* a predios libres de la bacteria ayudan a difundir el patógeno (Wray 1985, Spier y col 1990, Veiling y col 2000).

En contraste, *Salmonella typhimurium* se considera ubicuitaria, distribuida en una amplia variedad de huéspedes, incluidos animales domésticos (animales de abasto y compañía), silvestres (roedores, reptiles, aves) y humanos (Wray 1985, Spier y col 1990, Van-Duijkeren y col 2003). Cuando el patógeno afecta al ganado bovino son más gravemente afectados los terneros y las hembras adultas recién paridas desarrollándose, en ambos, cuadros de enteritis aguda los que pueden complicarse en ciertas ocasiones. La persistencia de animales portadores de *Salmonella typhimurium* es poco común y la eliminación de la bacteria al medio ambiente es por un corto tiempo (Wray 1985, Blood y Radostitis 1992, Sanchez y col 2002). *Salmonella typhimurium* es la segunda bacteria del género de importancia en enfermedades transmitidas por alimentos, asociada directamente al consumo de carnes rojas y productos y subproductos de la industria lechera (Sanchez y col 2002, Zhao y col 2002, Bellido y col 2003), en Chile, ha sido aislada desde muestras clínicas de pacientes humanos (Heitmann y col 1999). En primer lugar de importancia en ETA, se señala a *Salmonella enteritidis*, siendo involucrados directamente los productos comestibles de la industria avícola (Bellido y col. 2003). *Salmonella typhimurium* es la bacteria del género que presenta mayor porcentaje de resistencia a antibióticos y se considera que posee potencial para desarrollar resistencia a nuevos antimicrobianos (Cruchaga y col 2002, Gil-Setas y col 2002). *Salmonella typhimurium* DT104 es el fago de mayor implicancia en salud pública, se aísla principalmente desde bovinos, su característica de importancia, es el desarrollo de multiresistencia a antibióticos, dentro de los cuales se señala a: ampicilina, tetraciclina, estreptomina, cloranfenicol, flumequina, kanamicina, trimetropin y sulfanamidas, además se ha señalado la especial implicancia de la resistencia a fluoroquinolonas y ciprofloxacino, resistencias que pueden ser traspasadas a la población humana (Wall y col 1995, Orden y de la Fuente 2001, Cruchaga y col 2002, Bacon y col 2002, Sorensen y col 2002, Kiessling y col 2002, Van-Duijkeren y col 2003). El control de *Salmonella typhimurium* en las granjas es complicado, considerando la gran cantidad de fuentes de contaminación que pueden existir dentro del predio o que pueden llegar del exterior. Es así que, se han señalado como factores importantes en la presentación de enfermedad, debido a *Salmonella typhimurium*, la compra de alimentos contaminados y animales portadores, también se ha descrito el rol de vectores como roedores y aves silvestres en la propagación de este patógeno (Martin y Smith 1985, Spier y col 1990, Sanchez y col 2002).

En la literatura, se ha sugerido el uso de leche adicionada con antibióticos en la crianza de terneros, para de esta forma prevenir la infección con *Salmonella* spp. y la posible posterior eliminación de la misma en la materia fecal de estos animales, aunque los resultados de los estudios no son muy concluyentes (Wray y col 1987, Losinger y col 1995). Por otro lado, esto se contradice con la resistencia a antibióticos que desarrolla la bacteria, que está descrita ampliamente en la literatura y que se señala que puede ser adquirida por el uso de antibióticos

como profilácticos, promotores de crecimiento o subdosificaciones en el tratamiento de enfermedades en la industria ganadera (Spika y col 1987, Cordado y Virgilio 1996, Dargatz y col 2000, Guerra y col 2000, Fey y col 2000, Cruchaga y col 2001, Bacon y col 2002, Beach y col 2002, Zhao y col 2002, Chen y col 2004, Peek y col 2004). McLaren y Wray (1991), señalan que la mejor forma de prevenir y controlar la salmonelosis, es a través de una exhaustiva higiene, con buenas rutinas de desinfección, en todo lo que concierne al manejo de los animales. Además, señalan como inapropiado juntar animales de diferentes edades en un mismo corral.

En Chile, no existen estudios publicados acerca de la frecuencia de presentación de *Salmonella* spp. en los animales de granja. Es por esta razón, que se recurrió a literatura extranjera (Pacer y col 1989, Corrier y col 1990, Lance y col 1992, Losinger y col 1995, Fossler y col 2004) para establecer la frecuencia esperada de animales y predios positivos a *Salmonella* spp., que era necesaria conocer para poder desarrollar los cálculos señalados en los resultados (punto 5). De esta forma, se trabajó para la evaluación de la muestra obtenida, con una frecuencia estimada de presentación de *Salmonella* spp de 4%, tanto para el número de animales como para el número de predios positivos a la bacteria. Con este valor se logró respaldar estadísticamente los resultados obtenidos en este trabajo, de forma que si se hubiera conocido desde un principio del estudio la información necesaria para calcular el tamaño muestral, éste habría sido cumplido a cabalidad. Además como se señala en el punto 5.2, la frecuencia de predios positivos a *Salmonella* spp. encontrada en esta trabajo no fue producto del azar ($p = 0,0000$), demostrando que los datos presentados son representativos de la población estudiada.

De acuerdo a todo lo anteriormente planteado, se acepta la hipótesis que *Salmonella* spp. está presente en predios lecheros de la comuna de Paillaco, existiendo de esta forma en ellos fuentes de contaminación, constituyendo un riesgo de infección tanto para los animales de granja como para la población humana. Es importante recalcar que los serotipos aislados han sido descritos como agentes de enfermedad tanto en animales como en humanos. Finalmente cabe señalar que la información obtenida en este trabajo, puede ser utilizada para realizar futuros estudios de prevalencia de *Salmonella* spp. en predios ganaderos, con el fin de controlar la presentación de salmonelosis, tanto en animales como en humanos.

7. CONCLUSIONES

- *Salmonella* spp. esta presente en el 14,3% de los predios lecheros mayores a 100 hectáreas en la comuna de Paillaco.
- *Salmonella* *tiphymurium* está presente en mayor número de predios que *Salmonella* *dublin* en las explotaciones lecheras mayores a 100 hectáreas de la comuna de Paillaco.
- La evaluación de la representatividad del tamaño muestral, indicó que los resultados obtenidos en este trabajo son representativos de la población estudiada y que la frecuencia encontrada no fue producto del azar.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acha P, Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. Vol. I: Bacteriosis y micosis. OPS. Washington D.C.

Anderson RJ, House JK, Smith BP, Kinde H, Walker RL, Vande-steege BP, Breitmeyer RE. 2001. Epidemiologic and biological characteristics of *salmonellosis* in three dairy herds. *JAVMA* 219, 310-322.

Bacon RT, Sofos JN, Belk KE, Hyatt DR, Smith GC. 2002. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. *J Food Prot* 65, 284-290.

Barham AR, Barham B, Johnson A, Allen DM, Blanton J, Miller M. 2002. Effects of the transportation of beef-cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. *J Food Prot* 65, 208-283.

Beach JC, Murano EA, Acuff GR. 2002. Serotyping and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* in feedlot and non-feedlot beef cattle. *J Food Prot* 65, 1694-1699.

Bean NH, Griffin PM. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973, 1987: pathogens, vehicles, and trends. *J Food Prot* 53, 804-817.

Bellido JB, Galiano JV, Tirado MD, González-Cano JM, Safont L. 2003. Incidencia de los casos esporádicos de las infecciones intestinales más frecuentes en Castellón. *Rev Esp Salud Pública* 77, 629-638.

Blood DC, Radostitis OM. 1992. Medicina Veterinaria. Vol. 1, 7ª ed. Editorial Interamericana S. A. McGraw-Hill, México D.F.

Castillo RH. 2004. Detección de *Salmonella* spp. en heces de bovinos muestreados en una planta faenadora de carnes (Frival), Valdivia, Chile. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Codex Alimentarius. 2002. Higiene de los alimentos textos básicos. FAO y OMS. Roma.

Cohen ML, Tauxe RV. 1986. Drug-resistant *Salmonella* in the United States an epidemiologic perspective. *Science* 234, 964-969.

Cordado AM, Virgilio R. 1996. Evolution of drug resistance in *Salmonella panama* isolates in Chile. *Antimicrob Agents Chemoth* 40, 336-341.

Corrier DE, Purdy CW, Deloach JR. 1990. Effects of marketing stress on fecal excretion of *Salmonella* spp. in feeder calves. *Am J Vet Res* 51, 866-869.

Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H, Mcdermott PF, Ayers S, Meng J. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol* 70, 1-7.

Cruchaga S, Echeita A, Aladueña A, García-peña JN, Frias N, Usera MA. 2001. Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J Antimicrob Chemoth* 47, 315-321.

Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Ferris KE. 2000. Survey of *Salmonella* serotypes shed in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns. *J Food Prot* 63, 1648-1653.

D'Aoust JY. 1981. Update on preenrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J Food Prot* 44, 369-374.

D'Aoust JY. 1997. *Salmonella* species. En: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology fundamentals and frontiers. Pp 129-158. Editorial Ajm Pres, Washington, USA.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2003. Estrategia de la FAO relativa al enfoque de calidad e inocuidad de los alimentos basado en la cadena alimentaria: Documento marco para la formulación de la futura orientación estratégica. Roma (17ª sesión).

Fedorka-Cray PJ, Dargatz DA, Thomas LA, Gray JT. 1998. Survey of *Salmonella* serotypes in feedlot cattle. *J Food Prot* 61, 525-530.

Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* 342, 1242-1249.

FDA, Food and Drug Administration. 2003. Bacteriological analytical manual, BAM. 8th Edition *on line*. Disponible en: www.cfsan.fda.gov Consultado en: Febrero 2004.

Fossler CP, Wells SJ, Kaneene JB, Ruegg PL, Warnick LD, Bender JB, Godden SM, Halbert LW, Campbell AM, Geiger Zwald AM. 2004. Prevalence of *Salmonella* spp. on conventional and organic dairy farms. *JAVMA* 225, 567-573.

Gallego AR, Gallardo CS, Castro MG, Rodríguez LA. 2000. Control de calidad de medios de enriquecimiento para la detección y aislamiento de *Salmonella* spp. *Alimentaria* 37, 51-55.

Gay JM, Rice DH, Steiger JH. 1994. Prevalence of fecal *Salmonella* shedding by cull dairy cattle marketed in Washington state. *J Food Prot* 57, 195-197.

Gil-Setas A, Mazón A, Martín C, Urtiaga M, Inza ME. 2002. Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra. *Rev Esp Salud Pública* 76, 49-56.

Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza MC. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemotehr* 44, 2166-2169.

Hammack TS, Amaguaña RM, Andrews WH. 2001. Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. From low microbial load foods: collaborative study. *J of AOAC int* 84, 65-83.

Heitmann I, Hormazabal JC, Prat S, Fernandez A. 1999. Laboratorio de referencias de Enterobacterias Instituto de Salud Publica: *Salmonella-Shigella*, 1998. *El Vigía, boletín de vigilancia epidemiológica de Chile*. 2, 2-5.

Hirsch DC. 1994. *Salmonella*. En: Biberstein EL, Zee YC. Tratado de microbiología veterinaria. Pp 119-124. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 2000. Bergey's manual® of determinative bacteriology, 9th edition. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.

Huston CL, Wittum TE, Love BC. 2002. Persistent fecal *Salmonella* shedding in five dairy herds. *JAVMA* 220, 650-655.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1981. Microorganismos de los alimentos, métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. Vol. II. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

INE, Instituto Nacional de Estadísticas. 1998. VI Censo nacional agropecuario, 1997. Ministerio del Interior, Chile.

INE, Instituto Nacional de Estadísticas. 2004. Anuario de estadísticas agropecuarias, 2003-2004. Ministerio del Interior, Chile.

Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar *tiphymurium* on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl Environ Microbiol* 70, 2497-2502.

Jawetz E, Melnick J, Alderberg E, Brooks G, Butel J, Morse S. 2002. Microbiología médica. 17^a edición. El manual moderno, México.

Kiessling CR, Cutting JH, Loftis M, Kiessling W, Datta AR, Sofos JN. 2002. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates 1999-2000. *J Food Prot* 65, 603-608.

Kisch L. 1972. Muestreo de encuestas. Editorial Trillas. México D. F.

Lance SE, Miller GY, Hancock DD, Bartlett PC, Heider LE. 1992. *Salmonella* infections in neonatal dairy calves. *JAVMA* 201:864-868.

Le-Minor L. 1984. *Salmonella*. En: Krieg NR, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. Pp 427-458. Baltimore, Williams, Wilkins.

Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL. 2004. *Salmonella*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3rd Edition. Pp 143-167. Blackwell Publishing.

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Cassar CA, Clifton-Hadley FA, Lindsay LA, Threlfall EJ, Chappel SA, Davis RH. 2002. Investigation of the genetic diversity among isolates of *Salmonella enterica* serovar *dublin* from animals and humans from England, Wales and Ireland. *J Appl Microbiol* 93, 732-744.

Losinger WC, Wells SJ, Garber LP, Hurd HS. 1995. Management factors related to *Salmonella* shedding by dairy heifers. *J Dairy Sci* 78, 2464-2472.

Martin PA, Smith BP. 1985. Control of salmonellosis in dairy calves. En: International Symposium on Salmonella, New Orleans, pp:194-199.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mc-Caig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.

Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA, Oliver SP. 2002. Molecular characterization of *Salmonella* spp. Isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. *J Food Prot* 65, 1100-1105.

McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. 2003. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *J Appl Microbiol* 94, 693-700.

McLaren, IM, Wray C. 1991. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* infection in calves: persistence of salmonellae on calf units. *Vet Rec* 129, 461-462.

Nabbut, N. 1993. The *Salmonella* problem in Lebanon and its role in acute gastroenteritis. *J Food Prot* 56, 270-272.

Nielsen LR, Schukken YH, Gröhn YT, Ersboll AK. 2004. *Salmonella dublin* infection in dairy cattle: risk factors for becoming a carrier. *Prev Med Vet* 65, 47-62.

OMS, Organización mundial de la salud. 1988. Control de la Salmonelosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Ginebra. Serie de informes técnicos 774.

Orden JA, De la Fuente R. 2001. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Rev Esp Salud Pública* 75, 313-320.

Osborne AD, Pearson H, Linton AH, Shimeld C. 1977. Epidemiology of *Salmonella* infection in calves: the source of calf hood infection by *Salmonella dublin*. *Vet Rec* 101, 513-516.

Pacer RE, Spika JS, Thurmond MC, Hargrett Bean N, Potter ME. 1989. Prevalence of *Salmonella* and multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* in California dairies. *JAVMA* 195, 59-62.

Pacer SE, Miller GY, Hancock DD, Bertlett PC, Heider LE. 1992. *Salmonella* infections in neonatal dairy calves. *JAVMA* 201, 864-868.

Peek SF, Hartmann FA, Thomas CB, Nordlund KV. 2004. Isolation of *Salmonella* spp from the environment of dairies without any history of clinical salmonellosis. *JAVMA* 225, 574-577.

Pell AN. 1997. Manure and microbes: Public and animal health problem?. *J Dairy Sci* 80, 2673-2681.

Prado V, Solari V, Álvarez IM, Arellano C, Vidal R, Carreño M, Mamani N, Fuentes D, O'ryan M, Muñoz V. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. *Rev Méd Chile* 130, 495-501.

Richardson A. 1975. Salmonellosis in cattle. *Vet Rec* 96, 329-331.

Robinson RA, Blackburn BO, Murphy CD, Morse EV, Potter ME. 1985. Epidemiology of *Salmonella dublin* in the U. S. A. En: International Symposium on *Salmonella*, New Orleans, pp:182-188.

Sanchez S, Hofacre CL, Lee MD, Maurer JJ, Doyle MP. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. *JAVMA* 221, 492-497.

Sorensen O, Van Donkersgoed J, McFall M, Manninen K, Gensler G, Ollis G. 2002. *Salmonella* spp. shedding by Alberta beef cattle and the detection of *Salmonella* spp. in ground beef. *J Food Prot* 65, 484-491.

Smith BP, Oliver DG, Singh P. 1989. Detection of *Salmonella dublin* mammary gland infection in carrier cows, using an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in milk or serum. *Am J Vet Res* 50, 1352-1360.

Spier SJ, Smith BP, Tyler JW, Cullor JS, Dilling JW, Pfaff LD. 1990. Use of ELISA for detection of immunoglobulins G and M that recognize *Salmonella dublin* lipopolysaccharide for prediction of carrier status in cattle. *Am J Vet Res* 51, 1900-1904.

Spika JS, Waterman SH, Soo Hoo GW, Louis MES, Pacer RE, James SM, Bissett ML, Mayer LW, Chiu JY, Hall B, Greene K, Potter ME, Cohen ML, Blake PA. 1987. Chloramphenicol-resistant *Salmonella newport* traced through hamburger to dairy farms. *N Engl J Med* 316, 565-570.

Stabel JR, Hurd S, Calvente L, Rosenbusch RF. 2004. Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *J Dairy Sci* 87, 2177-2183.

Terragno T, Caffer MI, Bruno S, Binsztein N. 2003. Parte I: aislamiento, identificación y serotipificación. En: Malbran CG. Manual de procedimientos: *Salmonella*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Argentina.

Van Donkersgoed JT, Gram T, Cannon V. 1999. The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* in the feces and rumen of cattle at processing. *Can Vet J* 40, 332-338.

Van Duijkeren E, Wannet WJB, Houwers DJ, Van Pelt W. 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from human, cattle, pigs, and chicken in the Netherlands from 1984-2001. *J Clin Microbiol* 41, 3574-3578.

Veiling J, Van Zijderveld FG, Van Zijderveld-Van Bommel AM, Barkema HW, Shukken YH. 2000. Evaluation of three newly developed enzyme-linked immunosorbent assays and two agglutination test for detecting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *dublin* infections in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 38, 4402-4407.

Wall PG, Morgan D, Lamden K, Griffin M, Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B. 1995. Transmission of multi-resistant strains of *Salmonella typhimurium* from cattle to man. *Vet Rec* 136, 591-592.

Wallace DJ, Van Gilder T, Shallow S, Fiorentino T, Segler SD, Smith KE, Shiferaw B, Etzel R, Garthright WE, Angulo FG, Foodnet Working Group. 2000. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne disease active surveillance network (foodnet)-1997. *J Food Prot* 63, 807-809.

Webster J. 1984. Calf husbandry, health and welfare. Editorial Collins, 8 grafton street, London, U.K.

Wells SJ, Fedorka-Cray P, Dargatz DA, Ferries K, Green A. 2001. Fecal shedding of *Salmonella* spp. By dairy cows on farm and at cull cow markets. *J Food Prot* 64, 3-11.

Woolcolck JB. 1984. Infección bacteriana e inmunidad de los animales domésticos. Editorial ACRICIBIA, S. A., Zaragoza, España.

White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PF, McDermott S, Wagner DD, Meng J. 2001. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N Engl J Med* 345, 1147-1154.

Wray C, Sojka WJ. 1977. Reviews of the progress of dairy science: bovine *salmonellosis*. *J Dairy Res* 44, 383-425.

Wray C. 1985. *Salmonella dublin* infection of cattle in England and Wales: Its epidemiology and control. En: International Symposium on *Salmonella*, New Orleans, pp:173-181.

Wray C, Todd JN, Hinton M. 1987. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* infection in calves: excretion of *S. typhimurium* in the faeces of calves in different management systems. *Vet Rec* 121, 293-296.

Zhao T, Doyle MP, Fedorka-Cray PJ, Zhao P, Ladely S. 2002. Occurrence of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104A in retail ground beef. *J Food Prot* 65, 403-407.

9. AGRADECIMIENTOS

- Al proyecto FONDECYT N° 1030857 (*), por el financiamiento parcial de este estudio.
- A la Dra. Erika Gesche, por su orientación en la realización del presente trabajo.
- A la Srta. Mónica Sáez, por su ayuda y colaboración.
- Al personal del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la comuna de Paillaco, por colaborar en la toma de muestras para este estudio.
- Al Profesor Francisco Marín, por su ayuda en el análisis estadístico.
- Al Sr. Guillermo Mann, por su ayuda y apoyo.
- A mis amigos, por estar presentes y ser parte de mi vida.

* San Martín B, Borie C, Gesche E, Morales M. 2003. Monitoreo de la resistencia bacteriana en animales de producción.