

**INCIDENCIA DE SALMONELLA ENTERICA SUB ESPECIE ENTERICA
SEROTIPO ENTERITIDIS EN FINCAS PRODUCTORAS DE HUEVOS
PARA LA MESA EN PUERTO RICO**

Por

Yelitza M. Rivera Pintado

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Industria Pecuaria

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ**

2009

Aprobado por :

José R. Latorre Ph.D.
Presidente Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón Ph. D.
Miembro Comité Graduado

Fecha

Aixa Rivera MS
Miembro Comité Graduado

Fecha

José R. Latorre Ph.D.
Director Industria Pecuaria

Fecha

Aristides Armstrong, MS
Representante Estudios Graduados

Fecha

Abstract

The egg industry of Puerto Rico has a local production of 15.8 million dozens of egg and 26.8 million dozens are imported. The eggs are one of the most nutritious foods on Earth and can be part of a healthful diet. Nevertheless, they are perishables like meat and fish. One bacteria that can cause a disease transmitted by foods and can be present in eggs is known as *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis (SE). The main objective of this investigation was to do a risk assessment of the presence of this microorganism in Puerto Rico Laying Houses. The poultry houses were selected randomly, covering the five regions of Puerto Rico. The sampling included environmental samples of feces, feeders, drinkers, walkways, egg belts, and de-escalators where the eggs pass. The detection of *Salmonella* spp. was carried out according to the Food and Drug Administration (FDA) official method ("Detection of *Salmonella* in Environmental Samples from Poultry Houses") and modified according to the method used by the Dr. A.M. Saeed, according to personal communication. The confirmation of the colonies of *Salmonella* spp. as *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis was carried out by serological tests. The results of this study demonstrated the presence of *Salmonella* spp. in eight farms of the East, West, and Central regions. The results were distributed in all the analyzed areas, being feces, the area of greater incidence. The confirmation for *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis was negative in all the cases.

Resumen

La industria de huevos de Puerto Rico tiene una producción local de 15.8 millones de docenas de huevo y se importan 26.8 millones de docenas. Los huevos son uno de los alimentos más nutritivos en la tierra y pueden ser parte de una dieta saludable. Sin embargo, son perecederos como la carne y los pescados crudos. Una de las bacterias que puede causar enfermedad transmitida por los alimentos y que puede estar presente en los huevos se conoce como *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis. El principal objetivo de esta investigación fue determinar si en las fincas de producción de huevos en Puerto Rico se encuentra este microorganismo, para así poder obtener un panorama de la incidencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis que existe actualmente. Las fincas de huevos seleccionadas para el muestreo fueron elegidas aleatoriamente, cubriendo todas las regiones de Puerto Rico. El muestreo incluyó muestras ambientales de la excreta, comederos, bebederos, pasillos, correas y escaleras transportadoras por donde pasan los huevos. La detección de *Salmonella* spp. se llevó a cabo según el método propuesto por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) (“Detection of *Salmonella* in environmental samples from poultry houses”) y modificado con el método utilizado por el Dr. A.M. Saeed, según comunicación personal. La confirmación de las colonias de *Salmonella* spp. como *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis se efectuó mediante pruebas serológicas. De acuerdo a los resultados de este estudio, se demostró la presencia de *Salmonella* spp. en ocho fincas de las regiones Este, Oeste y Central. Los resultados se distribuyeron en todas las áreas muestreadas, siendo la excreta el área de mayor incidencia. La confirmación para *Salmonella* Enteritidis fue negativa en todos los casos.

Derechos de Autor Reservados ©

Yelitza M. Rivera Pintado

2009

Dedico este trabajo a Dios,
a mis padres Jorge L. Rivera Marrero y Carmen M. Pintado Meléndez,
por todo su amor, paciencia, apoyo y por darse la tarea a lo largo de estos años de
que alcanzara una educación. A todas esas personas que estuvieron siempre a mi
disposición tanto en mi vida universitaria, como en la personal.

Agradecimientos

Primero deseo agradecer a Dios que me ha dado la salud y la sabiduría a lo largo de esta travesía. Doy gracias a mi consejero y padre académico, Dr. José R. Latorre, por su ayuda, paciencia, y estímulo durante mis estudios. Lo respeto como profesor y como gran ser humano y me honra sinceramente haber trabajado bajo su supervisión. Quisiera expresar mi gratitud a las profesoras Dra. Edna Negrón y Aixa Rivera, por su participación en mi comité graduado, su ayuda y consejos. Al Profesor A. Mahdi Saeed de Michigan State University por ayudarme con el método de análisis microbiológico.

Agradezco al Departamento de Industria Pecuaria y el Programa Graduado de Ciencia y Tecnología de Alimentos por la ayuda financiera y por el apoyo institucional brindado durante mis estudios graduado. También quisiera agradecer al Fondo para el Fomento de la Industria de Huevos por proporcionar parte de la ayuda financiera y permitirme utilizar sus fincas durante la realización de este experimento.

Quisiera expresar mi aprecio a muchos profesores, estudiantes, y personal del Departamento de Industria Pecuaria y del Programa Graduado de Ciencia y Tecnología de Alimento que cooperaron con mi investigación. Gracias especiales a la Dra. Lynette E. Orellana y a la estudiante Yadira Rodríguez Soto por su ayuda para el uso del equipo de laboratorio y sugerencias valiosas del análisis microbiológico. En particular agradezco también la ayuda del al Dr. Ernesto

Riquelme por siempre tener una contestación a mis preguntas y ayudarme a pesar de no ser parte de mi comité.

Me gustaría expresar mi eterno agradecimiento a mi familia que siempre me apoyó y me hizo entender que el esfuerzo valdría la pena en un futuro. También a una persona muy especial tanto en mi vida universitaria como en la personal, Agro. Damaris Román Ruiz. Aprecio profundamente tu paciencia, comprensión y apoyo. Mi aprecio por tu buena voluntad de ayudarme y por acompañarme a la mayoría de las fincas a coleccionar las muestras y al laboratorio al momento de analizar las mismas. Gracias, por ser una excelente amiga.

Le doy las gracias a mis amistades que siempre estuvieron pendientes a que realizara este trabajo, especialmente al Agro. Arnaldo Ramos y el Sr. Felix (Pichy) Irizarry. En la recta final, al Agro. Edgardo J. Torres quien realmente me motivó a que terminara mi tesis y que últimamente me ha ayudado a alcanzar muchos logros. Finalmente, agradezco a todas las personas que de una manera u otra me dieron el estímulo para la terminar mi investigación.

Cuadro de Contenido

LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE APENDICES.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISION DE LITERATURA.....	5
3.1 Taxonomía.....	5
3.2 Patogénesis.....	6
3.3 Fisiología.....	7
3.4 Características ecológicas y epidemiológicas.....	8
3.5 <i>Salmonella</i> en huevos.....	9
3.6 Contaminación de huevos por transmisión vertical.....	10
3.7 Contaminación de huevos por transmisión horizontal.....	11
3.8 Contaminación de huevos por transmisión lateral.....	12
3.9 Síntomas de enfermedad en pollos.....	13
3.10 Salmonelosis.....	14
3.11 Incidencia.....	15
3.12 Brotes.....	17
4. MATERIALES Y METODOS.....	19
4.1 Localización de las fincas.....	19
4.2 Localización fincas muestreadas.....	22
4.3 Equipos y materiales.....	23
4.4 Recolección y transporte de las muestras.....	25
4.5 Análisis microbiológico.....	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSION.....	44
7. RECOMENDACIONES.....	45
8. REFERENCIAS.....	47
9. APENDICES.....	51

Lista de Cuadros

Cuadro 4.1. Miembros Fondo Fomento Industria de Huevos del País.....	20
Cuadro 4.2. Fincas activas de gallinas ponedoras.....	21
Cuadro 4.3. Localización de las fincas de gallinas ponedoras muestreadas.....	22
Cuadro 5.1. Resumen de muestreo para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	30
Cuadro 5.2. Datos a base de las fincas totales.....	30
Cuadro 5.3. Datos a base de las fincas activas.....	32
Cuadro 5.4. Datos a base de las fincas muestreadas.....	35
Cuadro 5.5. Muestreo de <i>Salmonella</i> Enteritidis de muestras ambientales: resultado de 15 fincas.....	39
Cuadro 5.6. Porcentaje de <i>S. Enteritidis</i> de muestras ambientales.....	40

Lista de Figuras

Figura 3.1.	Estructura del huevo.....	9
Figura 4.1.	Localización de las fincas.....	19
Figura 4.2.	Localización de las fincas activas de gallinas ponedoras.....	21
Figura 4.3.	Localización de las fincas muestreadas de gallinas ponedoras... 	22
Figura 4.4.	Recolección de muestras.....	25
Figura 4.5.	Agar Xilosa-Lisina-Tergitol 4.....	26
Figura 4.6.	Agar de hierro y triple azúcar.....	27
Figura 4.7.	Agar hierro y lisina.....	27
Figura 4.8.	Preparación prueba con antisuero.....	28
Figura 4.9.	Preparación prueba con antisuero.....	28
Figura 4.10.	Preparación prueba con antisuero.....	29
Figura 5.1.	Distribución fincas totales.....	31
Figura 5.2.	Distribución fincas activas.....	32
Figura 5.3.	Localización de las fincas positivas a <i>Salmonella</i> spp.....	34
Figura 5.4.	Distribución fincas activas muestreadas.....	35
Figura 5.5.	Distribución fincas muestreadas positivas a <i>Salmonella</i> spp.....	36
Figura 5.6.	Distribución de <i>Salmonella</i> spp. por área de muestreo.....	40
Figura 5.7.	Áreas de distribución de <i>Salmonella</i> spp. por región.....	41

Lista de Apéndices

Apéndice 1.	Codificación de las fincas muestreadas.....	52
Apéndice 2.	Comunicación Personal – Mahdi Saeed.....	53
Apéndice 3.	Gallinas para producción de huevos en granjas.....	54
Apéndice 4.	Estimado del consumo de productos agrícolas.....	55
Apéndice 5.	Ingreso bruto de la agricultura de Puerto Rico.....	56
Apéndice 6.	Distribución del valor de la producción agrícola.....	57
Apéndice 7.	Agar de hierro y triple azúcar.....	59
Apéndice 8.	Agar hierro y lisina.....	62

Introducción

La industria de huevos para la mesa produce para el consumo humano huevos mercadeados en cascarón o productos de huevo. Según el Departamento de Agricultura, para el año fiscal 2006-2007, la industria de huevos de Puerto Rico produjo 15.8 millones de docenas de huevo y se importaron 26.8 millones de docenas. El total disponible para consumo fue 42.6 millones de docenas, del cual solo el 37 por ciento representa la producción local. Para el año fiscal 2006-2007, esta industria ocupó el onceavo lugar de importancia económica agrícola, aportando el 2.04 por ciento del valor de la producción agrícola.

La industria de huevos para la mesa ha crecido de pequeñas unidades de producción en las cercanías al área metropolitana, a unidades más grandes y modernas (automatizadas), las cuales están situadas alrededor de las zonas rurales. Esto se debe a múltiples factores, como lo es el valor del terreno, disponibilidad de mano de obra, y menor densidad poblacional (Nazario y Ochoa, 2001).

En los huevos intactos, limpios y frescos pueden hallarse bacterias que suelen causar enfermedades de origen alimentario (USDA, 2003). Las enfermedades transmitidas por alimentos o envenenamiento por alimentos son ocasionalmente causadas por el consumo de alimentos o bebidas contaminadas con bacterias patógenas, toxinas, virus o parásitos. Esta contaminación usualmente ocurre por el manejo, la preparación o el almacenaje inadecuado de alimentos (CDC, 2005a). Algunas enfermedades comunes son ocasionalmente transmitidas a través del agua y

otras rutas, como el contacto del alimento con plagas, especialmente las moscas, roedores y cucarachas.

Una de las bacterias que puede causar una enfermedad transmitida por los alimentos y que puede estar presente en los huevos se conoce como *Salmonella*. Esta bacteria puede encontrarse fácilmente en nuestra cadena alimenticia y en el ambiente. Este microorganismo puede llegar al ser humano por contacto con el entorno o al ingerir alimentos. Los organismos suelen estar presente en huevos crudos o poco cocidos, carnes crudas o poco cocidas, la leche no pasteurizada y los alimentos derivados de ella. Otras fuentes de exposición pueden incluir el agua contaminada y el contacto con personas o animales infectados, tanto salvajes como domésticos.

Salmonella spp. causa diversos tipos de salmonelosis. La salmonelosis es una infección bacteriana que generalmente afecta el tracto intestinal y ocasionalmente, el torrente sanguíneo. La mayoría de las personas expuestas a *Salmonella* spp. pueden presentar diarrea grave o leve, fiebre, calambres y en algunos casos, vómitos. Los ancianos, los lactantes y quienes tienen el sistema inmunológico comprometido son las personas más susceptibles a contraer una enfermedad grave y poner en peligro su vida.

El número de los huevos afectados es sumamente pequeño, pero han surgido mayor número de casos de esta enfermedad producida por los alimentos en los últimos años. Debido al número de brotes y las muertes causadas por *Salmonella* Enteritidis (SE) que se asocian al consumo de huevos, el 22 de septiembre de 2004, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) junto con el Departamento de Salud y Servicios Humanos, propuso una regla para prevenir la

Salmonella enterica serotipo Enteritidis en huevos durante la producción (FDA-CFSAN, 2004b). En esta ley hay una serie de pasos para todos los productores de huevos que tienen 3,000 o más gallinas ponedoras. El plan de acción identifica los sistemas y las prácticas que se deben realizar para poder llegar a la meta de eliminar las enfermedades de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis asociadas al consumo de huevos antes de 2010.

El propósito de esta investigación fue hacer un catastro de las fincas productoras de huevo de mesa en Puerto Rico para obtener la incidencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis que existe actualmente. Con la información obtenida en un futuro se podría establecer un plan de acción para la reducción de esta bacteria.

2. Objetivos:

1. Realizar un catastro en las fincas productoras de huevo de mesa en Puerto Rico.
2. Establecer la incidencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en dichas fincas.
3. Sugerir medidas preventivas y futuros experimentos.

4. Revisión de Literatura

3.1. Taxonomía

Entre los bacilos gram negativos que causan gastroenteritis, los más importantes son los miembros del género *Salmonella*. Se conoce que la bacteria *Salmonella* spp. ha estado causando enfermedades por más de 100 años. Esta bacteria recibe su nombre por Daniel Elmer Salmon, un patólogo veterinario norteamericano aunque, fue su colega y contemporáneo Theobald Smith (conocido por su trabajo con anafilaxis) quien descubrió la bacteria por primera vez en 1885, aislándola de cerdos con cólera (Brands, 2006). El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae* y son anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadoras de glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativa y suelen ser móviles (Doyle et al., 2001; Jay , 2003b).

El género *Salmonella* ha sufrido muchos cambios en su taxonomía. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) ha adoptado como su nomenclatura oficial el siguiente esquema. El género *Salmonella* contiene dos especies, cada una con sus múltiples serotipos. Las dos especies son *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* se subdivide, a su vez, en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houenae* (IV), e *indica* (VI) y son diferenciables entre sí bioquímicamente (Doyle et al., 2001).

3.2. Patogénesis

Desde el punto de vista de patogénesis, el género *Salmonella* se puede dividir en dos grupos. Un grupo que típicamente causa enfermedades sistémicas y está involucrado raramente en enfermedades transmitidas por alimentos, mientras que el otro grupo solo produce enfermedades sistémicas bajo circunstancias especiales y típicamente produce enfermedades por los alimentos (Barrow, 1999).

El primer grupo consiste de un pequeño número de serovares que característicamente producen enfermedades sistémicas. Estas inicialmente involucran el sistema reticuloendotelial en un número limitado de hospederos (Barrow, 1999). Este incluye *Salmonella* Typhi y *S. Paratyphi* en ratones, *S. Gallinarum* y *S. Pollorum* en aves, *S. Dublin* en ganado, *S. Choleraesuis* en cerdos y otros pocos serovares (Barrow, 1999; FDA, 1998). Este grupo de serovares afecta mayormente los animales. Algunos de los organismos en este grupo pueden ser patógenos humanos y transmitirse a través de los alimentos (FDA, 1998).

El segundo grupo de *Salmonella*, agrupa el resto de los serovares y no está restringido a algún hospedero (Barrow, 1999). Los más notables en este grupo son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* y son capaces de producir enfermedades clínicas bajo ciertas circunstancias (Barrow, 1999). Este grupo se compone de los serovares que mayormente infectan los humanos. Este incluye los patógenos humanos como *S. Typhi* y *S. Paratyphi* que causan la fiebre tifoidea y para-tifoidea respectivamente, las enfermedades más severas causadas por *Salmonella*. *S. Typhi* se puede encontrar en la sangre al igual que en la orina antes de desarrollarse la fiebre tifoidea. La fiebre tifoidea tiene una alta tasa de mortandad; el síndrome paratifoideo es generalmente

poco severo. Estas enfermedades se esparcen a través de alimentos y agua contaminada con heces y orina de pacientes contaminados y portadores como roedores y cucarachas (FDA, 1998).

3.3. Fisiología

Salmonella spp. es un grupo de microorganismos que se adaptan fácilmente a condiciones extremas. Sobrevive favorablemente a estados de congelación y deshidratación. Los organismos que se encuentran en alimentos en estado seco y con actividad de agua relativamente baja son más resistentes al calor (Scott, 1999). Estas bacterias son capaces de crecer en un amplio rango de temperatura; desde como 2° hasta 4° C (36-39° F) y a altas temperaturas de 54° C (129° F) (FDA, 2004; Doyle et al., 2001). Según Jay (2003b) la temperatura mínima es entre 5.3° hasta 6.2 ° C (41.5-43.2° F) y la máxima es de 45° C (113° F). La temperatura óptima para crecimiento está entre 35° hasta 37° C (95-98.6° F) (Scott, 1999).

Según Doyle et al., (2001) *Salmonella* tiene la habilidad de proliferar a pH entre 4.5 hasta 9.5. Valores bajo 4 y sobre 9 pueden ser bactericidas. Un pH mínimo de crecimiento puede ser 4.5, pero dependiendo del ácido utilizado para disminuir el pH, el mínimo puede ser 5.5 (Jay, 2003b). El pH óptimo de crecimiento es entre 6.5 hasta 7.5 (Doyle et al., 2001; Scott, 1999).

Salmonella spp. no crece en alimentos con actividad de agua de 0.93 o menos, y es inhibida por la presencia de sal en niveles entre 3 hasta 4 % (FDA,1998).

3.4. Características Ecológicas y Epidemiológicas

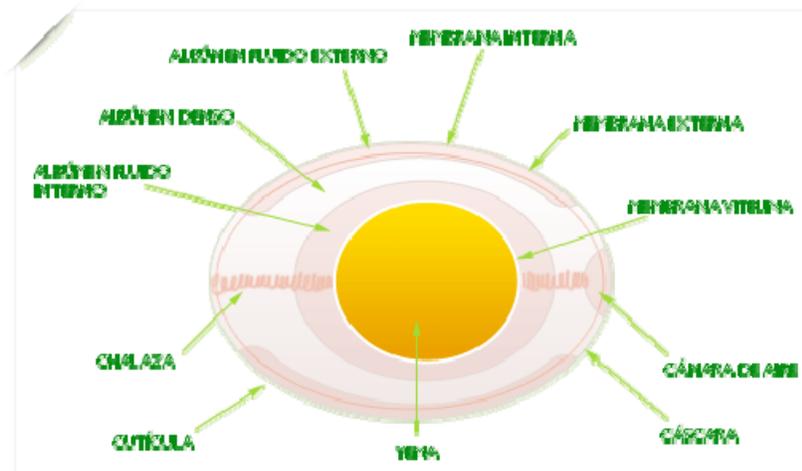
Salmonella spp. se encuentra distribuida por todo el mundo y es universalmente reconocida como un agente zoonótico. La bacteria *Salmonella* spp. se desarrolla en el conducto intestinal de los seres humanos y otros animales, entre ellos las aves. *Salmonella* spp. se transmite a los seres humanos al comer alimentos contaminados. Los alimentos contaminados pueden tener un aspecto y olor normal (CDC, 2005c). Estos se contaminan a través de los equipos sucios con materia fecal y por ambientes contaminados. La contaminación cruzada se produce por el contacto de los alimentos crudos durante la elaboración con alimentos o utensilios contaminados con *Salmonella* spp., pudiendo ésta permanecer y multiplicarse en los equipos y en el ambiente.

Entre los productos alimenticios más comúnmente identificados como posibles vehículos de transmisión de *Salmonella* spp. se incluyen los huevos, carne de vacuno, carne de pollo, leche, queso, mayonesa, helado, alimentos envasados para niños, merengue y mantecado (CDC, 2005c; Erdoğan et al., 2002; Pignato et al., 1995). Los productos de origen aviar, tanto sus derivados cárnicos como los huevos, son considerados la fuente principal de envenenamiento confirmado por *Salmonella* spp. a los humanos (CDC, 2005b; Erdoğan et al., 2002; Lindell et al., 1994).

3.5. *Salmonella* en huevos

El huevo de la gallina es un ejemplo excelente de un producto que es normalmente protegido por sus características físicas (Jay, 2003a). Los huevos han sido valorados por la protección de su empaque natural. Un huevo fresco es bastante resistente a bacterias invasivas. Las defensas del huevo son mecánicas y químicas. Mecánicamente, el huevo consta de cuatro capas de protección que previenen que las bacterias alcancen los nutrientes de la yema: (1) el cascarón, (2) la membrana externa y la membrana interna entre el cascarón y la clara, (3) la albúmina o clara y (4) la membrana vitelina que sujeta la yema. La albúmina o clara tiene propiedades químicas que inhiben el crecimiento de bacterias (FDA, 1998).

Figura 3.1. Estructura del huevo



El interior de los huevos frescos es prácticamente estéril. Sin embargo, muchos microorganismos se pueden encontrar en su exterior y bajo ciertas condiciones pueden entrar al huevo, desarrollarse y causar deterioro en un periodo corto de tiempo luego de su postura. La velocidad en que éstos entran está relacionada con la temperatura de almacenamiento, la edad del huevo y el nivel de contaminación (Jay, 2003a). La contaminación del contenido del huevo puede ocurrir por transmisión vertical desde el ovario u oviducto infectado o por transmisión horizontal mediante contaminación del cascarón con las heces de una gallina que excreta *Salmonella* spp. (Poppe, 1999).

La bacteria *Salmonella* Enteritidis es un patógeno entérico ligado a la industria de los alimentos. Es la causa de intoxicaciones alimentarias mas frecuentemente reportada. El consumo de huevos crudos o poco cocidos es la fuente dominante de infecciones de *S. Enteritidis* involucrada en brotes y en casos esporádicos. Esta incidencia de SE parece ser causada primordialmente a la habilidad adquirida de *S. Enteritidis* de infectar el ovario de la gallina y luego el huevo intacto (Angulo & Swerdlo, 1999).

3.6. Contaminación de huevos por transmisión vertical

Los huevos pueden contaminarse por transmisión vertical, desde los ovarios y oviductos infectados durante la formación del huevo (Grijnspeerdt et al., 2005; Káiser, 2001; Kassaify, 2004; Thiagarajan et al., 1996b). El concepto de transmisión vertical considera la contaminación de la superficie del cascarón al pasar el huevo por

la vagina, contaminación de la yema en el ovario o contaminación durante el pasaje por el oviducto contaminado (De Buck, 2004). Según Tauxe (1999) se ha establecido claramente que estos serovares se alojan para siempre en los tejidos reproductivos de las gallinas, donde el contenido del huevo puede ser infectado antes de que se forme el cascarón. Las gallinas ponedoras raramente presentan signos de la enfermedad cuando se infectan y continúan su postura y alimentación normalmente (Humphrey, 1999).

Las infecciones en el ovario con *Salmonella* Enteritidis resultan en la postura de huevos contaminados y en la eclosión de huevos infectados. Estas aves infectadas crecerán y producirán más huevos contaminados (Thiagarajan et al., 1994).

3.7. Contaminación de huevos por transmisión horizontal

El huevo también puede contaminarse por transmisión horizontal, *Salmonella* Enteritidis penetra el cascarón del huevo al estar contaminado con las heces de la gallina depositadas en el exterior del huevo al pasar a través de la cloaca (De Buck et al., 2004; Grijspeerdt et al., 2005; Kassaify & Mine 2004; Thiagarajan et al., 1996a; Thiagarajan et al., 1996b). Gast y Beard (1990) reportaron una correlación positiva entre las heces contaminadas artificialmente con *S. Enteritidis* y la contaminación en los huevos.

Se ha demostrado que *S. Enteritidis* puede penetrar los poros del cascarón (si está presente en la superficie del huevo) a medida que este se va enfriando, antes de que se seque la cutícula (Humphrey, 1999; Poppe, 1999). Después de que está formado el cascarón, *Salmonella* spp. puede entrar al interior del huevo antes de que se establezca en la superficie la barrera de proteína para prevención de invasión de bacterias al contenido del huevo (Poppe, 1999).

Esta ruta de infección es facilitada por el cascarón del huevo húmedo, almacenamiento a temperatura ambiente y daños en el cascarón (Jay, 2003a; Gast & Beard 1990). Bajo estas condiciones, el crecimiento del microorganismo es favorecido, seguido de una penetración a través del cascarón y las membranas internas del huevo (Jay, 2003a).

3.8. Contaminación de huevos por transmisión lateral

Otra ruta propuesta por Kaiser y Lemont (2001) es la transmisión lateral. La misma ocurre por contaminación a través del alimento, agua, e instalaciones o vía vectores, como por ejemplo, aves silvestres, roedores, animales domésticos y humanos (Kaiser & Lamont, 2001; Poppe, 1999). La penetración al interior del huevo por *Salmonella* y otras bacterias aumenta con la duración del contacto con material contaminado, especialmente durante el almacenamiento a altas temperaturas y alta humedad relativa (FDA, 1998).

La presencia de *S. Enteritidis* en el ambiente de los ranchones de gallinas ponedoras generalmente es aceptado como una indicación sensitiva y relevante de los

huevos contaminados que pueden producirse. El potencial de la circulación del aire para diseminar patógenos en ranchos de ave es demostrado en algunos estudios que reportan la transmisión de *S. Enteritidis* en el aire (Gast et al., 2004).

En general, cuando *Salmonella* spp. está presente en el exterior de los huevos ésta muere rápidamente, pero la sobrevivencia puede ser posible por una alta humedad relativa y baja temperatura. Está claro que *S. Enteritidis* puede persistir largos periodos de tiempo en huevos almacenados a temperatura ambiente. En un estudio llevado a cabo en Inglaterra, esta bacteria fue aislada de huevos que fueron almacenados por mas de cinco semanas entre 20° hasta 21° C (68-69.8° F) (Humphrey, 1999).

3.9. Síntomas de la enfermedad en pollos

Los síntomas de enfermedad de *S. Enteritidis* en pollos se ven mayormente en aves jóvenes. Estos pueden exhibir síntomas incluyendo anorexia, adipsia, depresión, plumas erizadas, mantenerse apiñados en grupos, reacio a moverse, somnolencia, deshidratación o diarreas blancas. Durante la segunda semana de vida del pollito pueden ocurrir fallas en crecimiento y puede tener una apariencia de aturdimiento (Poppe, 1999). Morbidez y mortandad dentro de las primeras 24 horas de vida sin la identificación de una posible ruta lateral de infección puede sugerir una transmisión vertical. La parvada de los padres es a menudo clínicamente normal a pesar del aislamiento de *S. Enteritidis* del contenido fecal, del polvo y de la camada (Poppe, 1999).

3.10. Salmonelosis

El envenenamiento por alimentos causado por bacterias del género *Salmonella* se conoce con el nombre de salmonelosis. De acuerdo al CDC, la salmonelosis causa un estimado de 1.4 millones de casos de enfermedades alimentarias y más de 500 muertes anualmente en los Estados Unidos. El reporte de investigación del Programa Activo de Investigación de Enfermedades Transmitidas a través de los Alimentos (FoodNet, por sus siglas en inglés) del 2004, identifica *Salmonella* spp. como la infección bacteriana más comúnmente reportada. (42 % *Salmonella*, 37 % *Campylobacter*, 15 % *Shigella*, 2.6 % *E.coli* O157:H7 y 3.4 % otros como *Yersinia*, *Listeria* y *Vibrio*).

La mayoría de las personas infectadas con *Salmonella* spp. tienen diarrea, fiebre y calambres abdominales entre 12 hasta 72 horas después de comer el alimento contaminado. Otros síntomas pueden incluir escalofríos, dolor de cabeza, náusea y vómitos. La enfermedad dura entre cuatro hasta siete días y la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento. Usualmente, las personas con diarrea se recuperan completamente, aunque puede tomar varios meses antes de que los intestinos vuelvan completamente a la normalidad. Sin embargo, en algunas personas la diarrea puede ser tan aguda que el paciente necesite hospitalización (CDC, 2005c; FDA, 2004; USDA, 2000). La infección se puede diseminar a la circulación sanguínea, entonces a otras áreas del cuerpo tales como a la médula o a las meninges del cerebro. Esta infección puede conducir a una enfermedad severa y fatal.

Las infecciones con *Salmonella* spp. pueden ser riesgosas para la vida, especialmente para infantes y niños pequeños, mujeres embarazadas y sus bebés por nacer y las personas de edad avanzada, así como la gente con el sistema inmunológico comprometido (como aquellos que sufren de HIV/SIDA, cáncer, diabetes, enfermedades de los riñones o pacientes de transplantes). Un número pequeño de individuos infectados con *Salmonella* spp. desarrollará dolores en sus coyunturas, irritación en los ojos y dolor al orinar. Esto se llama el Síndrome de Reiter. Puede tardar meses o años y puede causar artritis crónica, la cual es difícil de tratar (CDC, 2005c; USDA 2000).

3.11. Incidencia

En las pasadas dos décadas, la *S. Enteritidis* ha causado una pandemia a nivel mundial. Las infecciones de *Salmonella* spp. no tifoidea se convirtieron en preocupaciones importantes de la salud pública en las décadas de 1920's en Europa Occidental y en los 1950's y 1960's en Norteamérica. Desde entonces, en muchas partes desarrolladas del mundo, diversos serovares no tifoideos de *Salmonella* spp. han aumentado, incluyendo el serovar Typhimurium, pero menos dramáticamente que *S. Enteritidis*. Este serovar realmente emerge en Europa como una causa importante de la enfermedad humana entre los años de 1920's y 1930's, y fue asociado con frecuencia al consumo de los huevos de pato. De hecho, esta epidemia contribuyó a la desaparición de la industria de huevo de pato. Recientemente, en la industria de pollos, este serovar de *Salmonella* ha tenido una notable adaptabilidad (Tauxe, 1999).

Actualmente, *S. Enteritidis* es uno de los serotipos más común de *Salmonella*. En la década de 1970 la incidencia de infecciones de *S. Enteritidis* y el número de brotes en E.U aumentó dramáticamente (Braden, 2006; Tauxe, 1999). De todos los casos por *Salmonella* spp. en 1976 cerca de 5 por ciento se le atribuye *Salmonella* Enteritidis. Para el año 1985, esta proporción alcanzó el 10% (9.8) de los casos (Klippen, 2005; Patrick et al., 2004).

Sin embargo, para los años 1990, 1994, y 1999, *Salmonella* Enteritidis constituyó 20.6 por ciento, 26.3 por ciento, y 16.3 por ciento, respectivamente, de todos los casos de *Salmonella* spp. en los Estados Unidos (Klippen, 2005). Para el 1994 *Salmonella* Enteritidis fue el mayor serotipo de *Salmonella* spp. reportado (Braden, 2006).

El índice de los casos de *Salmonella* Enteritidis reportados al CDC aumentaron desde el 1976 hasta el 1996 de 0.6 a hasta 3.6 en una población de 100,000 (Klippen, 2005). A partir del 1996 la incidencia de infecciones de SE en humanos comenzaron a disminuir grandemente, pero continuaban surgiendo brotes relacionados a huevos de gallina contaminados (Braden, 2006).

En 2001, el índice de casos de *Salmonella* Enteritidis era 2.0 en una población de 100,000 y la contribución de este fue 213,046 con síntomas de la enfermedad, incluyendo 2,478 hospitalizaciones y 87 muertes (Klippen, 2005).

3.12. Brotes

El CDC define un brote de una enfermedad transmitida por los alimentos, como la ocurrencia de dos o más casos de una enfermedad de indigestión a causa de alimentos comunes (Scott, 1999). Los brotes de salmonelosis comúnmente ocurren cuando el mal manejo de alimentos permite la multiplicación de *Salmonella*. La cocción inadecuada y mal manejo de estos alimentos durante la preparación o servicio resulta en la ingestión de patógenos vivos presentes en el alimento (FDA, 1998). El número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad varía según la cepa del microorganismo y de la susceptibilidad del hospedero. En la mayoría de las cepas de *Salmonella* la dosis infecciosa es bien alta. Para *Salmonella* no tifoidea la dosis infecciosa entre 10^5 hasta 10^{10} células aproximadamente (Scott, 1999).

A partir de los años 1970 *S. Enteritidis* ha causado una serie de brotes en la parte noreste de los Estados Unidos y en parte de Europa (Jay, 2003b). Entre 1973 al 1984 el 44% de los brotes relacionados a *Salmonella* Enteritidis fueron relacionados al consumo de alimentos que contenían huevo (Jay, 2003b). En 1985, los Estados Unidos informaron al CDC 26 brotes relacionados a *Salmonella* Enteritidis (Klippen, 2005). Este problema cada vez fue mayor y consideró un asunto importante de la salud pública hasta 1986, cuando ocurrió un brote grande. Este brote, que afectó a cerca de 3,300 personas estimadas en siete estados (EEUU), fue causado por un producto de pastas rellenas, que contenían huevo crudo. Al determinar el origen de *S. Enteritidis*, los epidemiólogos identificaron a una sola granja de donde provinieron los huevos y tuvieron éxito en aislar enterobacterias de las muestras ambientales en la granja (Tauxe, 1999).

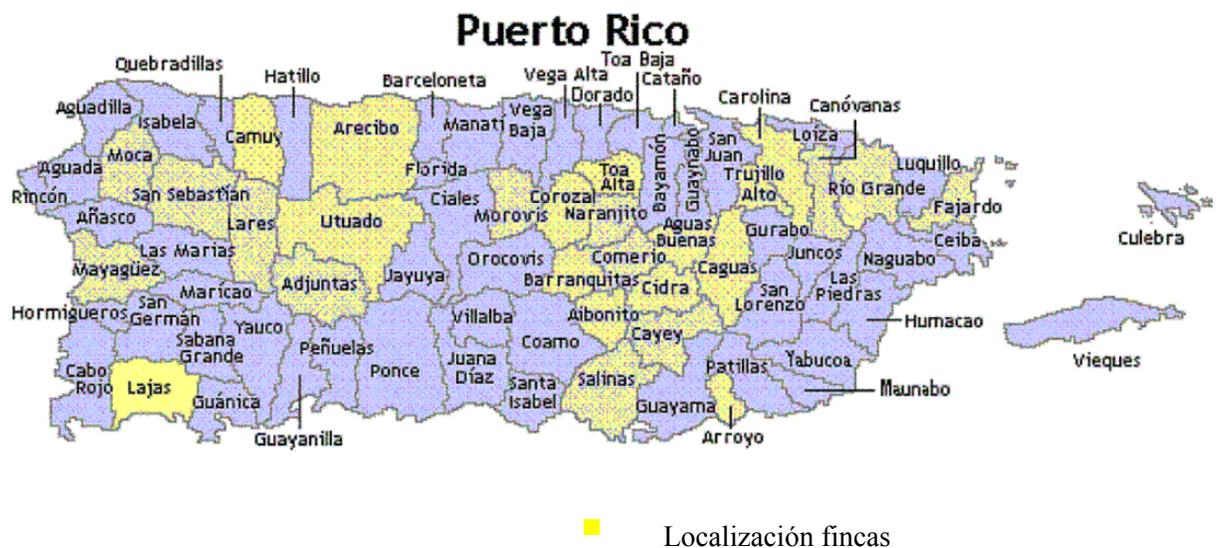
Para el 1990, aumentó a 85 el número de brotes reportados al CDC. En 1994 ocurrió un brote de *Salmonella* Enteritidis que afectó más de 224,000 personas en 41 estados de los Estados Unidos. El vehículo de contaminación fue un mantecado producido con leche transportada en un contenedor que previamente tenía huevo líquido (Jay, 2003b). En 1995 hubo 56 brotes confirmados, 50 brotes en el 2000 y 32 brotes para el 2002 (Klippen, 2005). Durante el año 1985 hasta 1998 se informaron 796 brotes de *S. Enteritidis* que causaron 28,689 enfermos, 2,839 hospitalizaciones y 79 muertes. De estos brotes, en 360 brotes de *S. Enteritidis* se pudo confirmar su origen, 279 (82%) fueron asociados al consumo de huevo crudo o poco cocido (CDC, 2000). Entre 1990 y 2001, un promedio de 78 por ciento de los brotes fueron causadas por *Salmonella* Enteritidis asociada a los huevos (Klippen, 2005).

4. Materiales y Métodos

4.1. Localización de las fincas

El Fondo para el Fomento de la Industria de Huevos del País consiste de 43 miembros distribuidos en 27 municipios de Puerto Rico. Dentro de este número se incluyen las fincas de gallinas ponedoras y las de gallinas de reemplazo. La distribución de las mismas se demuestra en la Figura 4.1.

Figura 4.1. Localización de las fincas



Para analizar los datos, las fincas se dividieron en cinco regiones: Este, Oeste, Metro, Central y Sur. Las regiones Este y Central constan de catorce (14) fincas cada una; la región Oeste de diez (10), la región Metro de dos (2) y la región Sur de tres (3). Esta distribución se refleja en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Miembros Fondo para el Fomento Industria de Huevos del País

	Región				
	Este	Oeste	Metro	Central	Sur
	Fajardo	Moca	Trujillo Alto	Cidra	Salinas
	Rio Grande	Lajas	Carolina	Cidra	Adjuntas
	Rio Grande	San Sebastián		Caguas	Arroyo
	Rio Grande	Mayagüez		Caguas	
	Canovanas	Lares		Caguas	
	Barranquitas	Camuy		Cayey	
	Morovis	Camuy		Cayey	
Pueblo	Toa Alta	Utuaado		Cayey	
	Corozal	Utuaado		Aguas Buenas	
	Comerio	Arecibo		Aguas Buenas	
	Comerio			Aibonito	
	Comerio			Aibonito	
	Comerio			Aibonito	
	Naranjito			Aibonito	
	14	10	2	14	3

A continuación, el Cuadro 4.2. menciona las fincas de gallinas ponedoras activas. No incluye las fincas de gallinas de reemplazos, ni las que actualmente por una razón u otra están vacías. La Figura 4.2. demuestra su localización.

Cuadro 4.2. Fincas activas de gallinas ponedoras

	Región				
	Este	Oeste	Metro	Central	Sur
	Rio Grande	Moca	Trujillo Alto	Cidra	Adjuntas
	Rio Grande	Lajas	Carolina	Caguas	Arroyo
	Barranquitas	San Sebastian		Aguas Buenas	
	Morovis	Mayagüez		Aibonito	
Pueblo	Toa Alta	Camuy		Aibonito	
	Corozal	Camuy			
	Naranjito	Utuaado			
		Arecibo			
	7	8	2	5	2

Figura 4.2. Localización de las fincas activas de gallinas ponedoras



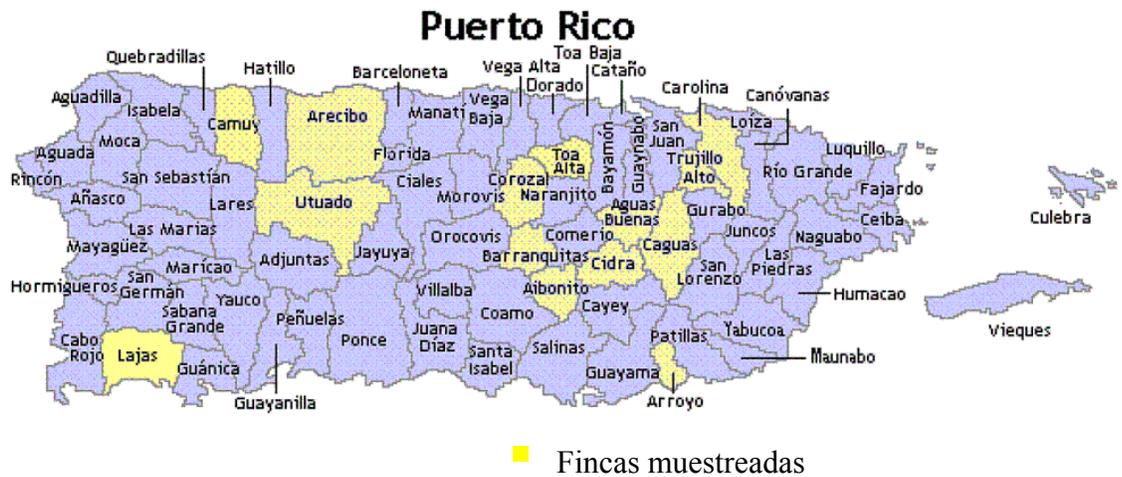
4.2. Localización fincas muestreadas

El muestreo se realizó únicamente en fincas productoras de huevos de mesa que sus propietarios voluntariamente ofrecieron sus facilidades para a llevar a cabo el monitoreo. Se muestrearon tres fincas para la región Este, cinco en la región Oeste, dos en la región Metro, cuatro en la región Central y una en la región Sur para un total de quince fincas muestreadas (Cuadro 4.3. y Figura 4.3.).

Cuadro 4.3. Localización de las fincas de gallinas ponedoras muestreadas

	Región				
	Este	Oeste	Metro	Central	Sur
	Barranquitas	Camuy	Trujillo Alto	Aibonito	Arroyo
Pueblo	Toa Alta	Camuy	Carolina	Caguas	
	Corozal	Utuaado		Aguas Buenas	
		Arecibo		Cidra	
		Lajas			
Total	3	5	2	4	1

Figura 4.3. Localización de las fincas muestreadas de gallinas ponedoras



4.3. Equipo, materiales y medios

A. Equipo y materiales

1. Gazas estériles (Bag, Speci-Sponge Environmental Samples for *Salmonella* and *Listeria*)
2. Guantes estériles
3. Pipetas 1ml
4. Pipetas 10ml
5. Portaobjetos
6. Leche sin grasa
7. Cordón
8. Etanol, 70%
9. NaCl, 0.85%
10. Incubadora, $35 \pm 2^\circ \text{C}$
11. Autoclave
12. Contenedor de transporte con gel para enfriar
13. Bata y botas para bioseguridad

B. Medios

1. Caldo Tetrionato (TT)
2. Agar Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT-4)
3. Agar de hierro y triple azúcar (TSI)
4. Agar hierro y lisina (LIA)
5. Antisuero *Salmonella* O Grupo D1

4.4. Análisis Microbiológico Recolección y transporte de las muestras

El muestreo Ambiental incluyó muestras de excreta, comederos, bebederos, pasillos, correas y escaleras transportadoras de huevos. Utilizando materiales estériles se tomaron dos muestras de cada área. Luego de colocarse los guantes estériles se procedió a añadir leche sin grasa para saturar la gasa estéril. La leche proporciona un entorno de protección para cualquier *Salmonella* y hace que el hisopo ligeramente pegajoso para fomentar la adhesión de las partículas.

Para los comederos, bebederos, correas y escaleras transportadoras de huevos las gasas se pusieron en contacto en múltiples áreas. En el caso de los pasillos y la excreta, la gasa fue atada asépticamente a un cordón (previamente esterilizado en autoclave) para poder arrastrarla a lo largo de las áreas.

Todas las muestras ambientales para el análisis microbiológico fueron colocadas individualmente en bolsas estériles “whirlpak” con suficiente leche sin grasa para mantener la gasa mojada (aproximadamente 15 ml). Estas bolsas fueron transportadas refrigeradas desde la finca y hasta la nevera del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Todas las muestras fueron identificadas con el nombre de la finca, fecha y el área de muestreo.

Figura 4.4. Recolección de muestras



4.5. Análisis Microbiológico

La detección y confirmación de *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Puerto Rico, según el método propuesto por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en “Detection of *Salmonella* in environmental samples from poultry houses” y modificado según el método utilizado por el Dr. A.M. Saeed (Apéndice 2). La detección incluyó un enriquecimiento en un medio líquido, un cultivo en un medio sólido selectivo y el examen de colonias típicas para *Salmonella* spp. La confirmación de las colonias de *Salmonella* spp. como *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis se realizó mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

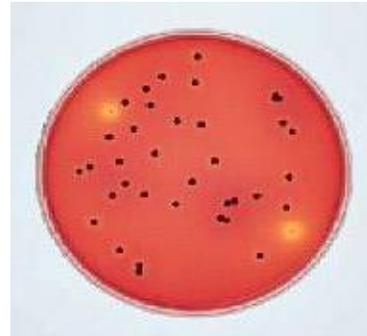
- Enriquecimiento en medio líquido

Se agitó el contenido de la bolsa que contenía la muestra. Luego se transfirió 1 ml de la muestra en 10 ml de caldo Tetracionato y se incubó durante 24 horas \pm 2 a 35.0 ° C.

- Aislamiento diferencial sobre medio sólido selectivo

A partir de los cultivos se sembró en estriado un asa llena de la muestra en Tetracionato a la superficie del medio sólido Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4). Se incubó por 48 horas \pm 2 a 35 ° C. Pasado este tiempo se examinaron los platos Petri para la formación de colonias presuntivas de *Salmonella* spp. negras o con centros negros (Figura 4.5.).

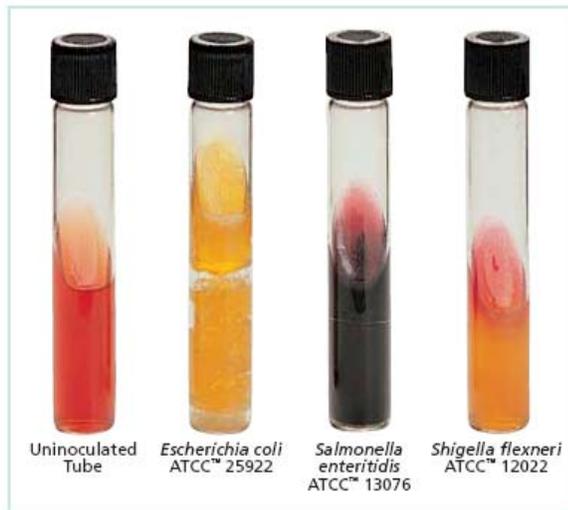
Figura 4.5. Medio Xilosa-Lisina-Tergitol 4



- Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas

Se seleccionaron cinco colonias típicas de cada plato y fueron transferidas a dos tubos de ensayo de Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI) y dos de Agar Hierro y Lisina (LIA) por 24 horas \pm 2 a 35 ° C. No se cerraron los tubos por completo para mantener condiciones aeróbicas y para prevenir el exceso de producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S). *Salmonella* Enteritidis típicamente produce una inclinación (“slant”) alcalino (rojo) y un fondo ácido (amarillo), con producción de H₂S (negro) y gas en TSI (Figura 4.6.).

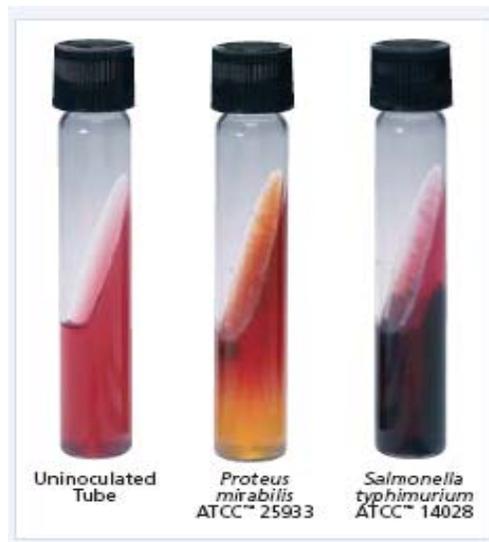
Figura 4.6. Agar de Hierro y Triple Azúcar



Fuente: Fisher Scientific-Difco ^{1M}

En LIA, *Salmonella* típicamente produce una reacción alcalina (violeta) en el fondo del tubo. La mayoría de los serotipos, de *Salmonella* como *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis, producen H₂S en LIA (Figura 4.7.).

Figura 4.7. Agar Hierro y Lisina



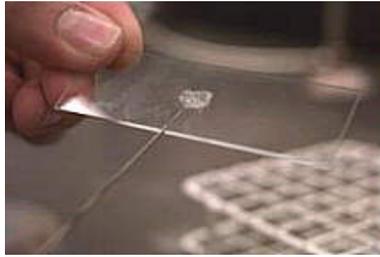
Fuente: Fisher Scientific-Difco TM

- Confirmación serológica de dichas colonias

Las colonias presuntivas de *Salmonella* spp. se sometieron a la prueba confirmativa como *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis mediante aglutinación con antisuero somático para el grupo D1.

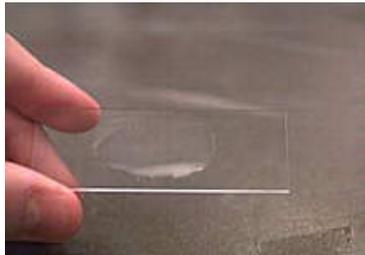
5. Se colocó una gota del antisuero en un portaobjetos. A partir del medio sólido de confirmación bioquímica, se transfirió un asa llena de crecimiento y se emulsionó la muestra (Figura 4.8).

Figura 4.8



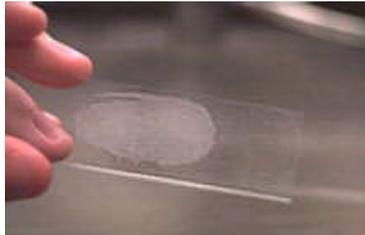
5. Se giró el portaobjetos durante 1 minuto (Figura 4.9).

Figura 4.9



5. Luego se efectuó la lectura para determinar si se había producido aglutinación y poder confirmar las colonias presuntivas como *Salmonella enterica* sub especie *enterica* serotipo Enteritidis (Figura 4.10). Los resultados se deben leer en el plazo de un minuto. Un resultado positivo debe mostrar un cambio de transparente a ligeramente lechoso con grumos.

Figura 4.10



5. Resultados y Discusión

En Puerto Rico, las fincas productoras de huevos están mayormente distribuidas en la región Este y Central, con un 32.56 % cada una, y un 23.25 % en la región Oeste. En las regiones Sur y Metro tienen un 6.98 % y un 4.65 % respectivamente. Tomando como base las 43 fincas totales, 24 son fincas activas y representan un 55.81 % del total. Se muestrearon 15 para un total de 34.88 %, luego fueron analizadas en el laboratorio para *Salmonella* Enteritidis. Ver Cuadro 5.1, Cuadro 5.2 y Figura 5.1.

Cuadro 5.1. Resumen de muestreo para *Salmonella* Enteritidis

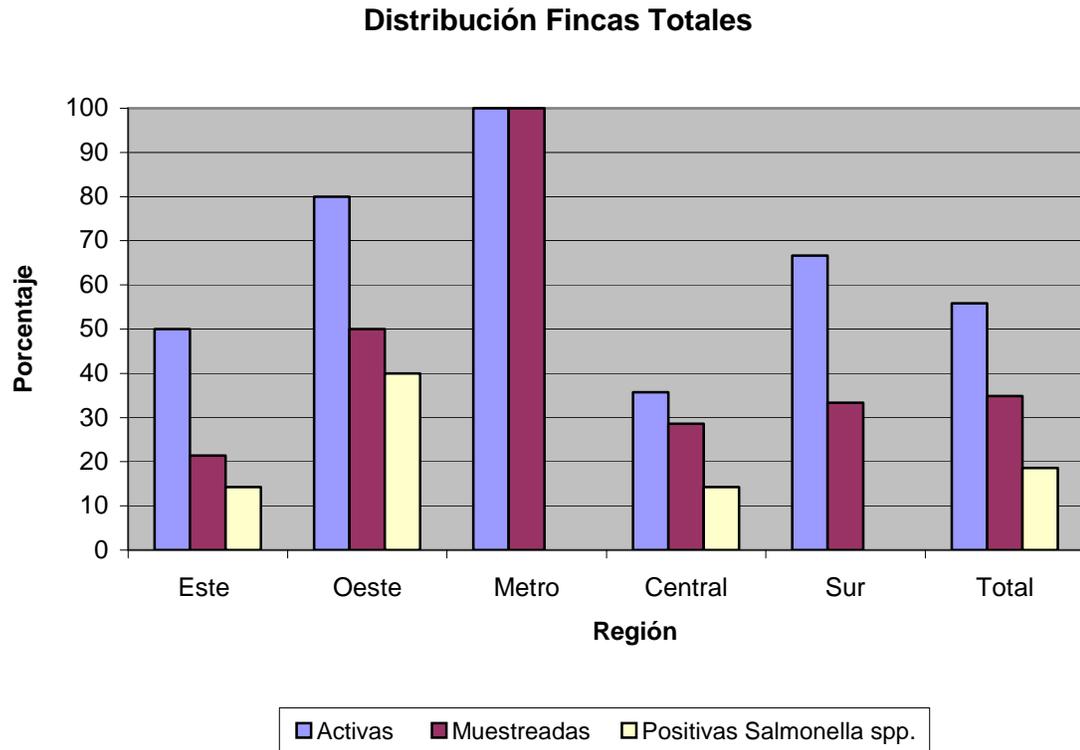
	Este	Oeste	Metro	Central	Sur	Total
Fincas Totales	14	10	2	14	3	43
Fincas Activas	7	8	2	5	2	24
Fincas Muestreadas	3	5	2	4	1	15

Cuadro 5.2. Datos a base de las fincas totales

	Este	Oeste	Metro	Central	Sur	Total
Fincas Totales	14	10	2	14	3	43
Fincas Totales %	32.56	23.25	4.65	32.56	6.98	100
Fincas Muestreadas %¹	21.43	50.00	100.00	28.57	33.33	34.88

¹Fincas muestreadas/ Fincas totales

Figura 5. 1. Distribución fincas totales



De las 24 fincas activas se muestrearon 15 para un total de 62.50 %. Las fincas con colonias presuntivas de *Salmonella* spp. en base a las fincas activas fue un 33.33 %. La región oeste fue la de mayor incidencia con un 50% de fincas positivas en base de las activas (Cuadro5.3 y Figura 5.2).

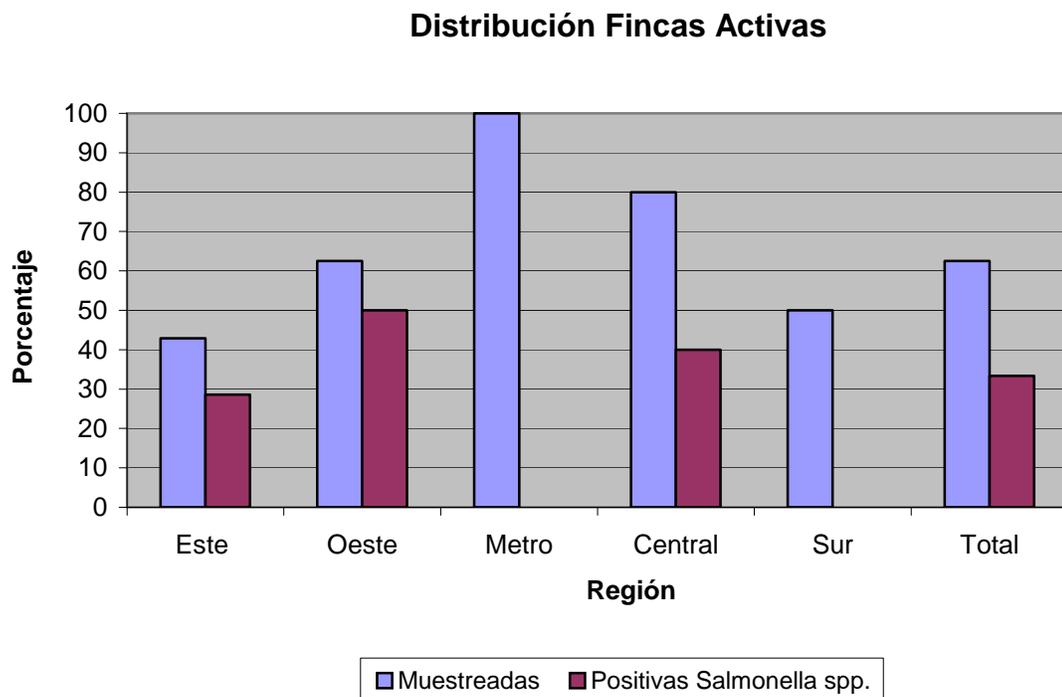
Cuadro 5.3. Datos a base de las fincas activas

	Este	Oeste	Metro	Central	Sur	Total
Fincas Activas	7	8	2	5	2	24
Fincas Activas %	50.00	80.00	100.00	35.71	66.67	55.81
Fincas Muestreadas %¹	42.86	62.50	100.00	80.00	50.00	62.50
Fincas Positivas <i>Salmonella</i> spp.²	28.57	50.00	0.00	40.00	0.00	33.33

¹Fincas muestreadas/ Fincas activas

²Fincas positivas/ Fincas activas

Figura 5. 2. Distribución fincas activas



Para cada finca muestreada se analizaron cinco áreas con dos repeticiones para un total de 150 muestras analizadas. Luego del enriquecimiento con TT se transfirieron a XLT4. Se ha encontrado que XLT4 inhibe el crecimiento de *Proteus*, *Pseudomonas*, *Providencia* y otras no *Salmonella*. Este medio contiene “proteose peptone”, que realiza la formación de colonias negras, producidas por la formación de ácido sulfúrico (Waltman, 1999). En este medio, 25 (16.67%) muestras mostraron colonias típicas negras. Estas colonias fueron aisladas, duplicadas y sometidas a los medios TSI y LIA para confirmación bioquímica.

Después de realizar la prueba bioquímica, 15 (60%) muestras resultaron positivos presuntivos a *Salmonella* spp. De las 15 muestras positivas a *Salmonella* spp., los resultados se dividieron entre ocho fincas positivas. Las fincas positivas a *Salmonella* spp. se distribuyeron dos en la región Este, cuatro en la región Oeste y dos en la región Central. En las regiones Metro y Sur no se encontraron muestras sospechosas. La figura 5.3. señala los pueblos que fueron muestreados en color amarillo y con un asterisco rojo los pueblos que obtuvieron presuntivos resultados positivos a *Salmonella* spp. Cada asterisco representa una finca.

Figura 5. 3. Localización de las fincas positivas a *Salmonella* spp.



Los resultados totales de colonias sospechosas a *Salmonella* spp. en base a las fincas muestreadas fue un 53.30 %. La región Oeste fue la de mayor incidencia con un 80%, seguida de la región Este y Central con 66.70 % y 50 % respectivamente (Cuadro 5.4 y Figura 5.4). De ocho fincas que resultaron positivas a *Salmonella* spp. ninguna fue de las regiones Metro y Sur. Las muestras positivas se sometieron a la prueba confirmatoria para *S. Enteritidis* por medio de antisuero, pero ninguna dio resultados positivos.

Cuadro 5.4. Datos a base de las fincas muestreadas

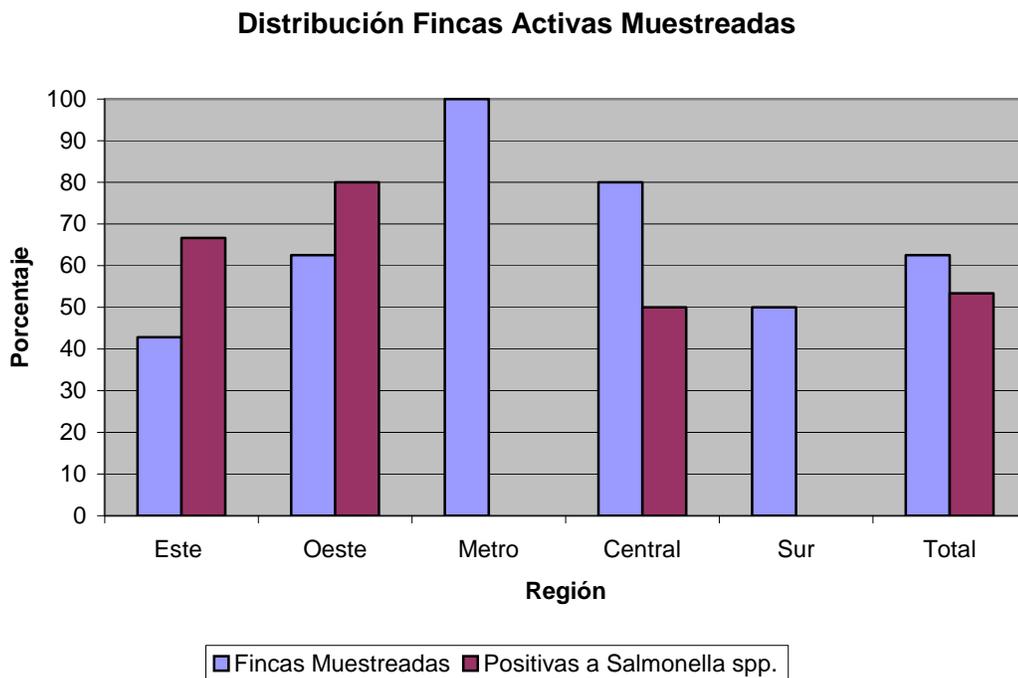
	Este	Oeste	Metro	Central	Sur	Total
Fincas Muestreadas	3	5	2	4	1	15
Fincas Totales Muestreadas %¹	21.43	50.00	100.00	28.57	33.33	34.88
Fincas Activas Muestreadas %²	42.86	62.50	100.00	80.00	50.00	62.50
Fincas Positivas <i>Salmonella</i> spp.%²	66.70	80.00	0.00	50.00	0.00	53.30
Fincas Positivas <i>S. Enteritidis</i> %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

¹Fincas muestreadas/ Fincas totales

²Fincas muestreadas/ Fincas activas

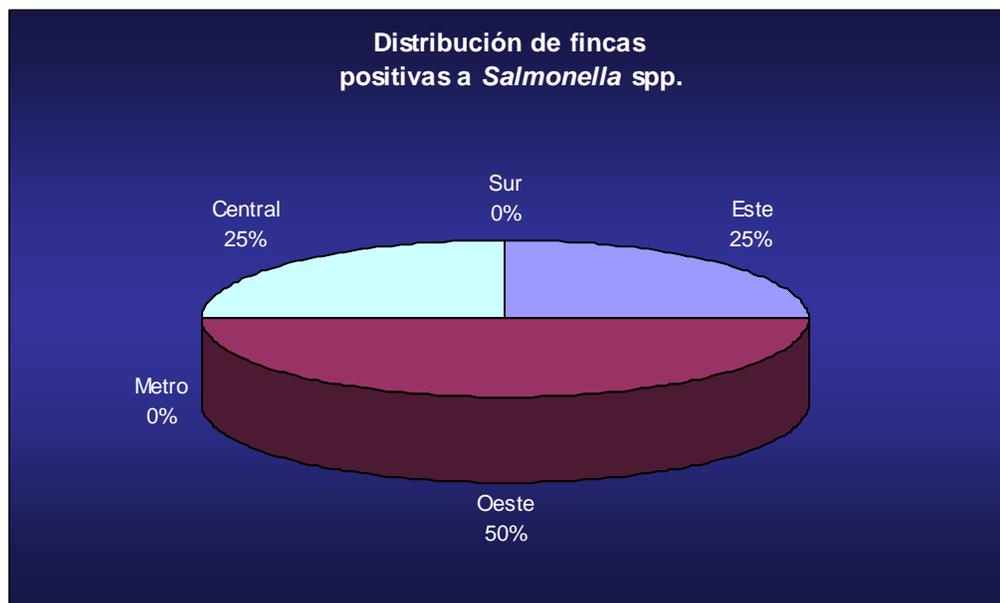
³Fincas positivas/Fincas muestreadas

Figura 5.4. Distribución fincas activas muestreadas



A continuación podemos observar en la Figura 5.5. la distribución de las ocho fincas positivas a *Salmonella* spp. En la región oeste se obtuvo cuatro fincas positivas para un total del 50 % de las fincas positivas, la región Central obtuvo dos para un 25% y la región Este dos también para el otro 25%.

Figura 5.5. Distribución fincas positivas a *Salmonella* spp.



Se han identificados muchos factores de riesgo para agravar la infección por *Salmonella* en las parvadas. Los insectos han sido asociados con la propagación de agentes patógenos causantes de brotes de enfermedades en humanos. Las cucarachas, los escarabajos y moscas se han recuperado de los ranchones de las aves de corral como vectores de *Salmonella* u otros patógenos (Holt, 2007). Microorganismo como

bacterias, que producen enfermedades, han sido encontrados en el cuerpo de las cucarachas. Estos microorganismos son transportados en las patas y cuerpo de las cucarachas, y son depositados en el alimento y utensilios que tocan.

Las moscas pueden transmitir bacterias tales como *Salmonella*, las cuales causan enfermedades alimentaria, a las gallinas y sus huevos. El microbiólogo Peter S. Holt y el entomólogo Christopher J. Geden, quienes trabajan con el Servicio de Investigación Agrícola (ARS), descubrieron que la mosca doméstica fácilmente adquiere las bacterias del ambiente. Cuando las gallinas comen las moscas, las bacterias se meten dentro de las aves (USDA, 2008).

En tres experimentos, Holt puso gallinas dentro de jaulas separadas adyacentes. Geden entregó pupas de mosca 48 horas antes de que las moscas empollen; este momento escogido aseguró que las moscas no fueron expuestas a cualquier microbio antes del surgimiento de las moscas. Las pupas de la mosca se pusieron en una caja abierta cerca de las gallinas. Después de tres días, los investigadores infectaron las gallinas por vía oral con las bacterias *Salmonella*. Los investigadores detectaron las bacterias dentro y encima del 45 al 50 por ciento de las moscas durante las primeras 48 horas después de su surgimiento (USDA, 2008).

Luego, algunas gallinas no infectadas fueron expuestas a las moscas nuevamente infectadas. La proximidad a las moscas no causa infección en las gallinas sanas, pero consumir las moscas infectadas sí las infectaron. Este resultado mostró que el contacto físico simple no es necesariamente el método principal de diseminación de las bacterias *Salmonella* a diferentes superficies en una finca. Pero, según los investigadores, el método principal de transmisión de las bacterias

Salmonella de las moscas a las gallinas probablemente es cuando las gallinas comen las moscas contaminadas. Según Holt, este descubrimiento muestra que las moscas en los gallineros son no sólo una molestia, sino también una amenaza a la seguridad de los productos avícolas (USDA, 2008).

En 15 estados de Estados Unidos de América, se estimó la prevalencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en el medio ambiente de 200 casetas de ponedoras comerciales y en los ratones habitantes de 129 casetas. Se tomaron hisopos de la excreta, correas transportadoras de huevos y pasillos. Se colocaron trampas para ratones durante cuatro a siete días. Tanto los hisopos como los ratones fueron enviados al laboratorio para cultivo bacteriológico. El 7.1% de las casetas de ponedoras y el 3.7% de los ratones fueron positivos a *S. enterica* serotipo Enteritidis. En total, el 7% de granjas resultó positivo a SE, probado en al menos 1 muestra, con un rango de prevalencia por región de 0% a 17%. Entre las granjas con SE en el ambiente, la contaminación fue generalizada: las muestras positivas se obtuvieron a partir de los correas transportadoras de huevo (48%), los escaleras transportadoras de huevos (45%), pasillos (18%) y la excreta (17%) (Braden, 2006 y Garber, 2003).

La presencia de la *S. enterica* serotipo Enteritidis en las casetas estuvo asociada con la edad, la muda forzada, el levante en el piso y el número de roedores atrapados. La limpieza y desinfección de las casetas estuvo asociada con un riesgo reducido. La prevalencia de *S. enterica* serotipo Enteritidis en los ratones obtenidos en las casetas con medio ambiente positivo fue casi cuatro veces mayor comparado con las casetas con medio ambiente negativo (Garber, 2003).

El muestreo de este estudio se llevó a cabo en cinco áreas de la finca. Para el estudio completo se tomaron 150 muestras. De estas siete fueron positivas en la excreta, tres en los bebederos, dos en los comederos, dos en las correas por donde pasan los huevos y una en los pasillos (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5. Muestreo de *Salmonella* Enteritidis de muestras ambientales: resultados de 15 fincas

Localización de la muestras	Total de muestras	Total muestras positivas	Porcentaje positivas
Excreta	150	7	4.67
Bebederos	150	3	2.00
Comederos	150	2	1.33
Correas	150	2	1.33
Pasillos	150	1	0.67

Del total de 15 muestras positivas, la mayor área de muestras positivas se obtuvo en la excreta, representando un 46.67% de las muestras positivas. De los bebederos se obtuvo un 20 %, seguido de los comederos y correas con un 13.33 %, respectivamente. La área donde se obtuvo el menor número de muestras positivas fue los pasillos, con 6.67 % (Cuadro 5.6 y Figura 5.6.). La figura 5.7. es un resumen de las muestras positivas a *Salmonella* spp. por región y área de muestreo.

Cuadro 5.6. Porcentaje de *Salmonella* Enteritidis de muestras ambientales

	Este	Oeste	Metro	Central	Sur	Total	%
Excreta	2	3	0	2	0	7	46.67
Bebederos	1	2	0	0	0	3	20.00
Comederos	0	1	0	1	0	2	13.33
Correas	1	0	0	1	0	2	13.33
Pasillos	1	0	0	0	0	1	6.67

Total muestras positivas = 15

Figura 5.6. Distribución de *Salmonella* spp. por área de muestreo

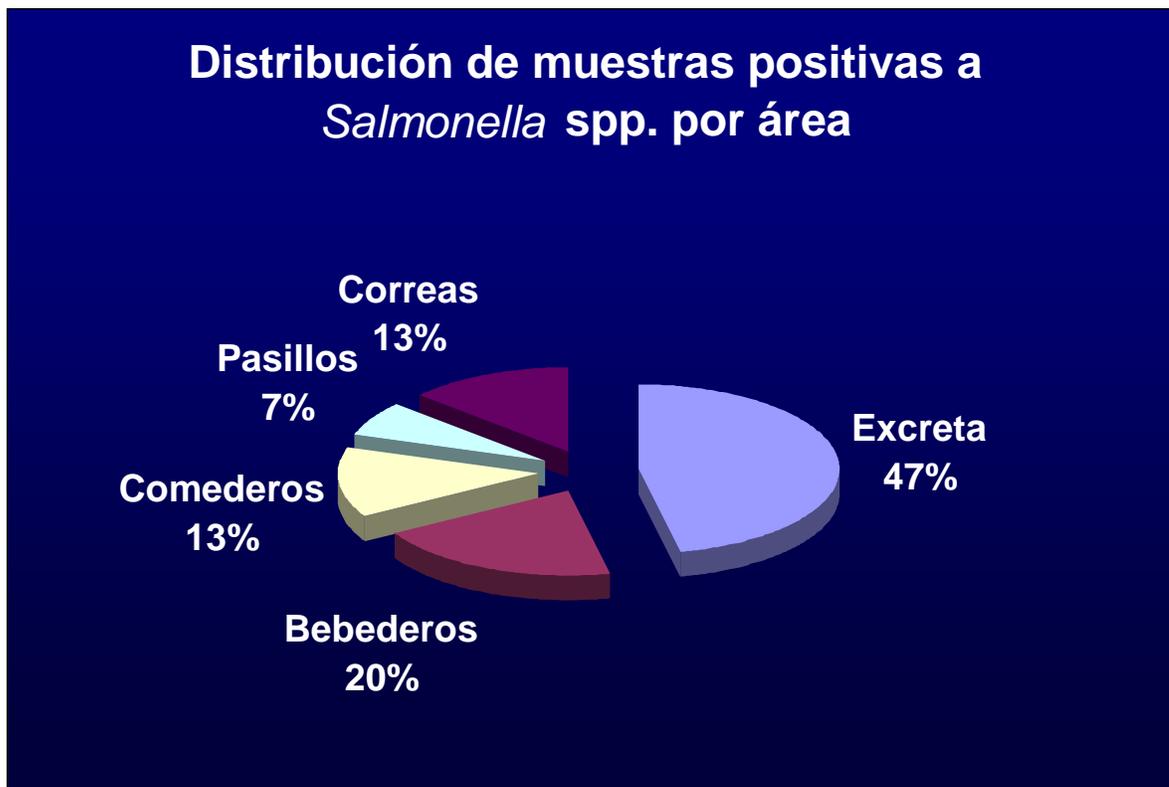
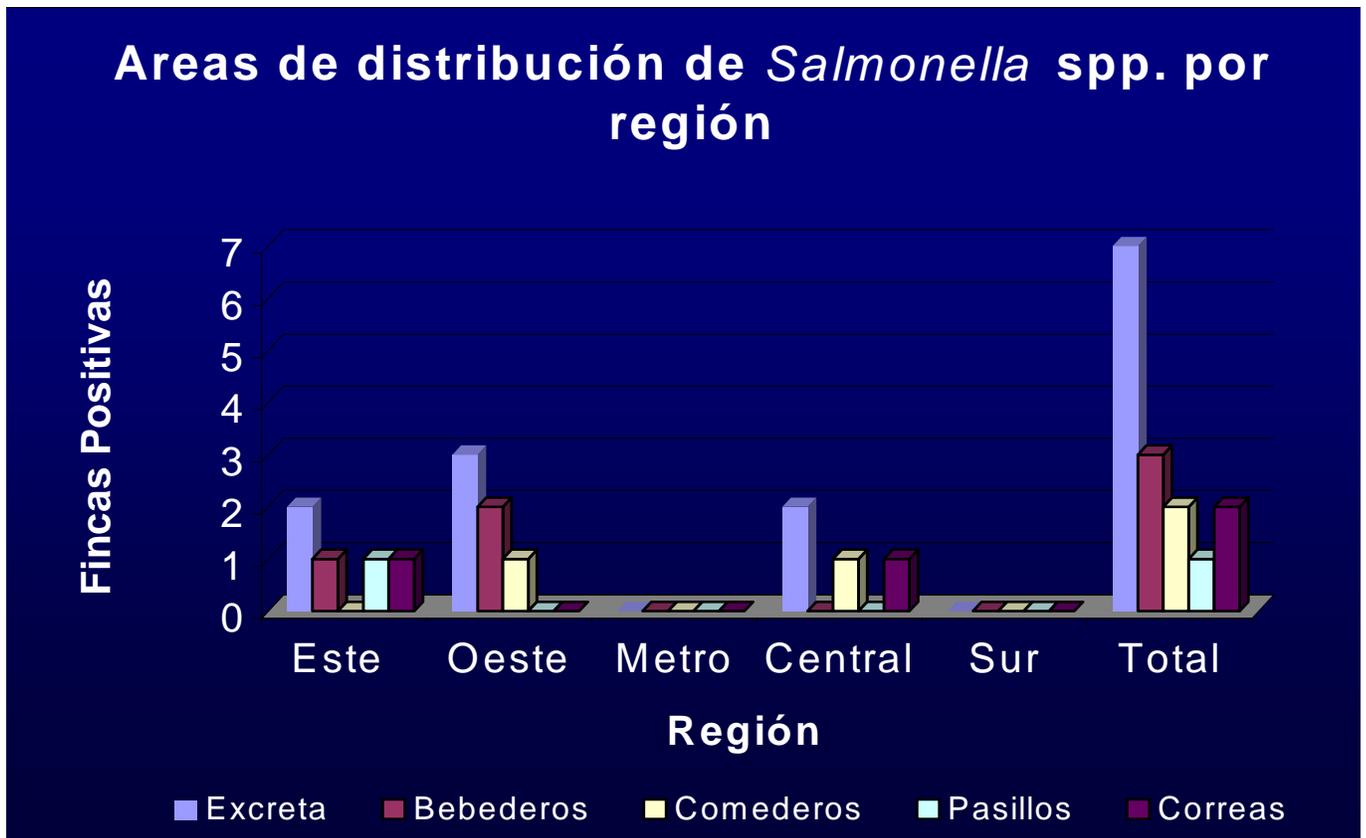


Figura 5.7. Áreas de distribución de *Salmonella* spp. por región



Siendo la excreta el área de mayor incidencia, podemos inferir que puede haber ocurrido una transmisión horizontal o lateral de *Salmonella* desde la excreta a las otras áreas de muestreo. En la mayoría de las fincas se pudo observar excreta de las gallinas ponedoras en contacto con los bebederos de la fila inferior. La gallina al tomar agua contaminada con las heces, puede transportar bacterias con su pico a otras áreas, lo que pudo haber causado una contaminación desde los bebederos hacia los comederos durante su alimentación.

Un huevo contaminado con las heces al pasar por la cloaca, puede permitir la detección de *Salmonella* en las correas transportadoras de huevos. Otros factores envueltos pudieron ser vectores como aves silvestres, ratones, cucarachas, moscas y entre otros. Estos transportan bacterias en su cuerpo esparciéndolas de un lado a otro al transportarse por todas las áreas de los ranchos. La contaminación en los pasillos surge por estos vectores, el aire y por los humanos que caminan de un lado a otro sin utilizar medidas de bioseguridad.

Medidas Preventivas

Bioseguridad implica el uso de todas las medidas posibles para controlar la propagación de organismos que causan enfermedades tales como *Salmonella* Enteritidis (SE). Estas medidas incluyen el control de tráfico de seres humanos, el aislamiento de las aves del equipo y los animales contaminados, el control de insectos y roedores, vacunación, desinfección y buena limpieza. Estos microorganismos suelen viajar de un lugar a otro en la excreta, el polvo y las plumas, transportadas por vía aérea y en las personas, equipos, vehículos, animales y otras aves. Por lo tanto, los mayores factores de riesgo para la introducción de organismos patógenos son las personas, equipos, y los animales contaminados.

La presencia de *Salmonella* Enteritidis mayormente se asocia con la existencia de gallinas portadoras, que liberan el microorganismo en el interior del huevo y con la existencia de la bacteria en la materia fecal de los animales. Para prevenir la infección por esta bacteria se debe tener mucho cuidado al comprar y conservar los

huevos. Aunque el cascarón sea la “barrera natural” que en teoría protege el interior del huevo (clara y yema), hay ocasiones en que la bacteria puede llegar a infiltrarse a través de ella y contaminarlo. Por este motivo, es necesario prestar atención a ciertos puntos, tanto a la hora de comprar los huevos como de conservarlos.

Aunque el huevo permanezca con su cutícula intacta, puede ser que el cascarón se encuentre contaminado externamente. Esta situación nos da un riesgo añadido, puesto que al tocar el cascarón con las manos, con las superficies, o al romper el huevo, puede que parte de los microorganismos de la superficie pasen al interior del huevo. El lavado, los golpes, la desecación y el envejecimiento, entre otros factores, pueden ocasionar la pérdida de la capa protectora. *Salmonella* también está presente en las heces de las gallinas, por esto, hay que evitar comprar huevos que tiene restos de estas. Además, no se recomienda lavarlos ya que la humedad podría también debilitar el cascarón y restarle su protección natural.

Muchas veces la incorrecta manipulación que hacemos de los alimentos es la principal causa de que nos contaminemos con la *Salmonella*. Para conservar los huevos, la mejor opción es guardarlos en el refrigerador a una temperatura estable y evitar todo cambio brusco de temperatura (puede deteriorar y debilitar el cascarón). No se debe mezclar los huevos con otro tipo de alimentos a la hora de conservarlos para evitar la contaminación cruzada. La falta de higiene durante la manipulación y el consumo de alimentos es la causa más común de algunas enfermedades alimentarias.

6. Conclusión

De acuerdo a los resultados de este estudio, no se encontró presencia de *Salmonella* Enteritidis en ninguna de las quince (15) fincas muestreadas. Por otro lado, sí se pudo observar la presencia de *Salmonella* spp. en ocho fincas de las regiones este, oeste y central. Los resultados se distribuyeron en todas las áreas muestreadas en las facilidades de las fincas, siendo la excreta el área de mayor incidencia.

En este catastro se pudo comprobar la existencia de contaminación con *Salmonella* spp. en el ambiente de las fincas de gallinas ponedoras, lo que puede causar posteriormente una transmisión del patógeno. Aunque la contaminación ambiental sigue siendo una ruta de transmisión, expertos en *S. Enteritidis* ahora creen que la ruta predominante es la transmisión vertical (FDA, 2004).

Un enfoque completo sobre la inocuidad alimentaria, desde la granja hasta la mesa, es necesario para reducir la salmonelosis. Los agricultores, la industria de alimentos, inspectores, vendedores, trabajadores en servicio de alimentos y los consumidores son cada uno un eslabón importante en la cadena de inocuidad alimentaria. La educación de productores de huevo en las buenas prácticas de saneamiento de la granja es un paso crítico al igual que la refrigeración de huevos entre la postura y la cocina.

7. Recomendaciones

Algunas precauciones que se deben tomar a la hora de manipular los huevos para evitar una posible contaminación:

- Comprar huevos con el cascarón intacto y limpio.
- Respetar la fecha de consumo impresa en la etiqueta del envase del huevo.
- No lavar los huevos antes de refrigerarse.
- No romper el huevo en el borde de los recipientes donde los vaya a batir.
- No se debe separar las claras de las yemas con el propio cascarón del huevo.
- Cocinar bien el huevo y mantenerlo en refrigeración hasta su consumo.
- No dejar alimentos que contengan huevos a temperatura ambiente.
- Evitar el contacto de alimentos crudos o poco cocidos con alimentos listos para comer, ya que puede producirse una transmisión de microorganismos de un alimento a otro (contaminación cruzada).

Para obtener un análisis más completo de la incidencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis que existe en Puerto Rico:

- Se debería buscar una autorización que permita realizar un estudio similar que abarque más cantidad de fincas.
- Hacer un análisis llevando acabo un monitoreo del contenido del huevo.
- Hacer una relación entre el muestreo ambiental y el contenido interno del huevo.
- Hacer una relación entre el cascarón y el contenido interno del huevo.

Referencias

1. Angulo, E.J y D.L. Swerdlow, 1999. **Epidemiology of Human *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Infections in the United States.** *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals, pp 33-41. Iowa State University Press, Iowa.
2. Barrow P.A. 1999. **Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis.** *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals, pp. 173-181. Iowa State University Press, Iowa.
3. Braden, C.R.. 2006. ***Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and egg: A National Epidemic in the United States.** Clinical Infectious Diseases. 43: 512-517.
4. Brands, D.A. 2006. **The history of *Salmonella*.** Deadly diseases and epidemics. *Salmonella*. p 16. Chelsea House Publishers.
5. Centers for Disease Control and Prevention. 2000. **Outbreaks of *Salmonella* Serotype Enteritidis Infection Associated with Eating Raw or Undercooked Shell Eggs – United States, 1996-1998.** Morbidity and Mortality Weekly Report. February 4, 2000. Vol. 49. No. 4.
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2005a. **Enfermedades transmitidas por alimentos.**
www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g_sp.htm
7. Centers for Disease Control and Prevention. 2005b. ***Salmonella* Enteritidis.**
www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salment_g.htm
8. Centers for Disease Control and Prevention. 2005c. **Salmonellosis.**
www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g_sp.htm
9. De Buck, J., F. Pasmans, F. Van Immerseel, F. Haesebrouck y R. Ducatelle. 2004. **Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens.** Poultry Science. 83:352-358.
10. Doyle, M.P, L.R. Beuchat y T.J. Montville. 2001. ***Salmonella* Species.** Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, pp. 141-178.

11. Erdoğrul, Ö.T., N. Özkan y E. Çakiroğlu. 2002. ***Salmonella* Enteritidis in quail eggs.** Turk. J. Vet. Anim. Sci. 26: 321-323.
12. FDA. Federal Register. 1998. ***Salmonella* Enteritidis in Eggs.** 63(96): 27503-27511.
13. FDA. Federal Register. 2004. **Prevention of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs During Production; Proposed Rule.** 69(183): 56823-56906.
14. FDA-CFSAN. 2004a. **Detection of *Salmonella* in Environmental Samples from Poultry Houses.**
<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmsalegg.html>.
15. FDA-CFSAN. 2004. Fact Sheet on FDA'S. **Proposed Regulation: Prevention of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs During Production.**
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs6.html>
16. Garber, L., et al. 2003. ***Salmonella enterica* serotype Enteritidis in table egg layer house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors.** Avian Disease. 47: 134-142.
17. Gast, R. K. y C. W. Beard. 1990. **Production of *Salmonella* Enteritidis contaminated eggs by experimentally infected hens.** Avian Diseases 34: 438-446.
18. Gast, R. K., B. W. Mitchelle y P.S Holt . 2004. **Evaluation of culture media for detecting airborne *Salmonella* Enteritidis collected with an electrostatic sampling device from the environment of experimentally infected laying hens.** Poultry Science 83: 1106-1111.
19. Grijspeerdt, K., J-U. Kreft y W. Messems. 2005. **Individual-based modeling of growth and migration of *Salmonella* Enteritidis in hen's eggs.** Int J Food Microbiol. 100: 323-333.
20. Holt, P.S., et al. 2007. **Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis from Houseflies (*Musca domestica*) found in rooms Containing *Salmonella* Serovar Enteritidis - challenged hens.** Appl. Environ. Microbiol. 73 (19): 6030–6035 .
21. Humphrey, T.J. 1999. **Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis.** *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals.183-192.

22. Jay, J.M. 2003a. **Miscellaneous Food**. Modern Food Microbiology. 6th ed, pp.163-175. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York.
23. Jay, J.M. 2003b. **Foodborne Gastroenteritis caused by *Salmonella* and *Shigella***. Modern Food Microbiology. 6 ed. Pp. 511-530. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York.
24. Kaiser, M.G. y S.J. Lamont. 2001. **Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure**. Poultry Science. 80: 1105-1108.
25. Kassaify, Z.G. y Y. Mine. 2004. **Effect of food protein supplements on *Salmonella* Enteritidis infection and prevention in laying hens**. Poultry Science. 83:753-760.
26. Klippen, K. 2005. **A new proposed law for eggs farms concerning *Salmonella* : How did we get here?**. Egg Industry. May 2005: 13-14.
27. Lindell, K.A., A.M. Saeed y G.P. McCabe. 1994. **Evaluation of resistance of commercial laying hens to experimental infection with *Salmonella* Enteritidis phage type eight**. Poultry Science. 73: 757-762.
28. Nazario, C. y Ochoa, J. 2001. **Sector de producción de Huevos**. Primer Congreso agropecuario Puertorriqueño.
29. Patrick, M.E., et al. 2004. ***Salmonella* Enteritidis Infections, united states, 1985-1999**. CDC Emerging Infectious Diseases. Vol 10. No.1. www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no1/02-0572.htm
30. Pignato, S., A.M. Marino, M.C. Emanuelle, V. Iannotta, S. Caracappa y G. Giammanco. 1995. **Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonella* in foods**. Appl. Environ. Microbiol. 61 (50): 1996-1999.
31. Poppe, C. 1999 **Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis**. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals, pp 3-18. Iowa State University Press, Iowa.
32. Saeed, A.M. 14 de noviembre de 2005. **Comunicación personal**.
33. Scott, V.N. 1999. **Peligros Biológicos y Controles**. HACCP - Un enfoque hacia la seguridad de los alimentos: Manual para el desarrollo e implementación de un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control. Tercera edición. pp 55-77.

34. Tauxe, R.V. 1999. **Salmonella Enteritidis: the continuing global public health challenge.** *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals, pp xi-xii. Iowa State University Press, Iowa.
35. Thiagarajan, D., A.M. Saeed y E.K. Asem. 1994. **Mechanism of transovarian transmission of Salmonella Enteritidis in laying hens.** Poultry Science. 73:89-98.
36. Thiagarajan, D., A.M. Saeed, J. Turek y E.K. Asem. 1996 a. **In vitro attachment and invasion of chicken ovarian granulose cells by Salmonella Enteritidis phage type 8.** Infection and Immunity. 64(12):5015-5021.
37. Thiagarajan, D., H.L. Thacker y A.M. Saeed. 1996 b. **Experimental infection of laying hens with Salmonella Enteritidis strains that express different types of fimbriae.** Poultry Science. 75:1365-1372.
38. USDA. 2000. **Salmonella enterica serotype Enteritidis in table eggs layers in the U.S.** USDA: APHIS: VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System. Fort Collins, CO. #N333.1000.
39. USDA. 2003. **Focus on Shell Eggs.** Fact Sheets.
http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Focus_On_Shell_Eggs/index.asp
40. USDA. 2008. SHOO FLY! Role of House Flies in Spreading *Salmonella* in Poultry.
<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar08/fly0308.pdf>
41. Waltman, W.D. 1999. **Methods for isolating Salmonellae from poultry and poultry environment.** *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals, pp 419-433. Iowa State University Press, Iowa.

Apéndices

Apéndice 1. Codificación de Fincas Muestreadas

Finca Codificada	Áreas Muestreadas	Áreas Positivas <i>Salmonella</i> spp.	Muestras Positivas <i>Salmonella</i> Enteritidis
A	5	1	0
B	5	2	0
C	5	3	0
D	5	3	0
E	5	2	0
F	5	0	0
G	5	0	0
H	5	0	0
I	5	0	0
J	5	0	0
K	5	0	0
L	5	2	0
M	5	1	0
N	5	0	0
O	5	1	0
Total	75	15 (20%)	0

Apéndice 2. Comunicación Personal – Mahdi Saeed

11/14/2005

Dear Yelitzia:

Dr. Mansfield has forwarded your e-mail to me since my area of specialty is Salmonella in poultry.

I have looked into your protocol for isolating salmonella from poultry house environment and founded it to be adequate. Actually, you can cut on several steps of enrichment since the use of 2x2 gauze soaked in sterile 2X skim milk to be passed on the line of manure in the pit of each house (use one gauze per line of manure). These gauze should be transported under refrigeration to the lab where thy can be enriched into Tetrathionet broth (plus iodine to be added as recommended on the tetrathionet preparation instruction when the broth is at 40C or less). It is a good practice to incubate the gauze swabs at 35-37C for 48 hours. Make sure that you add tetrathionet broth such that you maintain 1:10 ration which means that you should add about 50 ml of the tetrathinete broth per bag. After incubation for 48hours, make sure that you mix the bag content before you transfer a lapful to a well dried XLT4 plate. Incubate at 37C for 48 hours before you examine the plate for pinkish black-centered colonies. Transfer 3 well separated colonies to 3 TSIA slants, Streak the surface of each slant before you stab the slant with a needle to about one inch depth. Incubate at 37C overnight before examining for appropriate chemical reaction (link slant and black bottom suggestive of salmonella. If in doubt (for some rare isolates) inoculate and LIA slant and look for the reaction expected for salmonella. You must start serougrouping of the isolates from TSIA slant the second day or excessive growth may mask the seroidentity of the culture. Use group-specific sera (A, B, C, D, and E) *Salmonella*Enteritidis belong to group D. Use antisera from Difco or BBL sources, The antisera should cover D1 subgroups.

I have been using this protocol for years and it works and has sensitivity that surpass or match of any other protocol.

Need more help? let me know.

Mahdi Saeed
Professor of Epidemiology and Infectious Disease
Michigan State University

Apéndice 3. Gallinas para producción de huevos en granjas

Poultry on Farms: 2002 and 1998

Geographic area	Total				Chickens for egg production							
	Farms		Number		Pullets for replacement of laying flock				Layers			
					Farms		Number		Farms		Number	
	2002	1998	2002	1998	2002	1998	2002	1998	2002	1998	2002	1998
Puerto Rico	2,147	2,074	9,699,787	12,645,639	107	245	649,303	492,737	576	708	1,217,329	1,079,066
Adjuntas	79	72	13,468	8,237	7	16	105	272	12	34	10,347	5,705
Aguada	37	32	1,469	4,181	2	5	(D)	370	11	20	165	2,275
Aguadilla	2	15	(D)	1,136	-	1	(D)	(D)	2	11	(D)	915
Aguas Buenas	23	40	(D)	6,550	1	4	(D)	(D)	6	17	(D)	4,158
Aibonito	43	58	1,724,878	2,786,332	5	2	(D)	(D)	4	5	(D)	(D)
Añasco	29	20	1,238	549	2	-	(D)	-	14	4	414	(D)
Arecibo	41	11	1,655	2,296	1	2	(D)	(D)	16	26	730	1,581
Arroyo	5	11	(D)	(D)	1	2	(D)	(D)	3	4	(D)	(D)
Barceloneta	4	12	(D)	926	-	1	-	(D)	3	1	(D)	(D)
Barranquitas	49	60	749,196	934,529	-	4	-	(D)	10	17	(D)	(D)
Bayamón	4	13	166	794	2	4	(D)	(D)	2	8	(D)	570
Cabo Rojo	19	20	710	17,138	1	1	(D)	(D)	11	11	(D)	(D)
Caguas	35	24	170,968	399,172	2	2	(D)	(D)	9	4	(D)	(D)
Camuy	31	14	69,812	2,801	-	3	(D)	(D)	11	3	(D)	(D)
Canóvanas	22	26	(D)	(D)	3	4	(D)	(D)	10	7	(D)	(D)
Carolina	12	15	(D)	(D)	-	1	(D)	(D)	4	11	(D)	(D)
Cataño	-	1	-	(D)	-	-	-	-	1	-	-	-
Cayey	39	32	640,868	550,276	1	-	(D)	-	14	4	8,530	109
Celba	37	17	761	1,309	-	3	-	-	28	4	80	(D)
Ciales	51	29	4,080	4,562	-	-	-	-	11	7	703	148
Cidra	34	27	608,329	654,711	2	1	(D)	(D)	8	7	70,145	(D)
Coamo	90	116	2,138,888	3,889,418	2	3	(D)	(D)	7	8	185	128
Comerio	27	29	276,165	350,225	1	1	(D)	(D)	6	6	(D)	51,076
Corozal	78	50	319,031	415,056	3	7	(D)	(D)	16	7	(D)	(D)
Culebra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dorado	-	11	-	980	-	-	-	-	-	1	-	(D)
Fajardo	7	6	(D)	(D)	-	2	-	(D)	4	4	(D)	(D)
Florida	12	11	429	898	-	3	-	45	5	4	95	270
Guánica	-	2	-	(D)	-	1	-	-	1	1	-	(D)
Guayama	17	14	(D)	62,610	-	-	-	-	6	5	155	96
Guayanilla	26	13	1,611	407	1	2	(D)	(D)	6	8	120	179
Guaynabo	2	13	(D)	7,084	-	1	-	(D)	-	6	-	940
Gurabo	15	33	622	3,024	1	6	(D)	103	10	21	286	1,288
Hatillo	24	12	1,060	723	-	-	-	-	15	7	490	525
Hormigueros	2	10	(D)	(D)	-	-	-	-	-	4	-	(D)
Humacao	9	3	198	58	-	-	-	-	-	1	-	(D)
Isabela	15	17	920	660	-	2	-	(D)	-	7	-	105
Jayuya	58	61	2,453	2,821	4	11	240	184	21	22	690	555
Juana Díaz	14	7	709	(D)	-	1	-	(D)	6	1	135	-
Juncos	12	8	480	989	1	-	(D)	-	4	-	-	182
Lajas	16	6	(D)	(D)	-	2	-	(D)	1	3	(D)	(D)
Lares	80	93	(D)	39,224	6	19	125	330	21	35	(D)	(D)
Las Marías	72	65	3,536	2,826	2	11	(D)	204	22	24	520	527
Las Piedras	31	30	1,811	1,491	-	4	-	68	6	6	145	177
Loíza	3	3	101	371	-	1	-	(D)	3	3	60	(D)
Lquillo	6	10	377	(D)	-	4	-	70	2	6	(D)	(D)
Manatí	9	10	335	649	-	5	-	82	1	2	(D)	(D)
Manicao	41	53	2,019	2,539	2	8	(D)	115	10	21	310	572
Maunabo	5	13	276	640	-	1	(D)	(D)	3	2	55	(D)
Mayagüez	28	41	992	1,372	3	-	95	-	12	8	383	295
Moca	42	34	19,639	7,337	3	3	90	105	25	11	18,648	(D)
Morovis	58	29	(D)	(D)	6	5	(D)	(D)	15	16	(D)	(D)
Naguabo	13	12	684	758	2	4	(D)	(D)	1	1	(D)	(D)
Naranjito	32	26	155,263	240,867	-	1	-	(D)	10	9	373	241
Orocovis	96	45	8,277	(D)	4	5	280	190	24	23	967	621
Patillas	19	14	860	(D)	-	1	-	(D)	2	2	(D)	(D)
Penüelas	18	19	914	965	2	6	(D)	169	5	7	205	132
Ponce	16	47	975	1,379	1	2	(D)	(D)	8	6	315	102
Quebradillas	10	5	594	(D)	-	3	-	(D)	7	18	130	792
Rincón	9	25	287	1,379	-	-	-	(D)	-	-	-	-
Río Grande	22	12	92,369	126,711	3	3	(D)	123,800	7	5	(D)	(D)
Sabana Grande	23	30	1,222	2,132	1	1	(D)	80	12	19	328	822
Sainas	37	30	1,203,098	979,919	1	1	(D)	(D)	2	1	(D)	(D)
San Germán	34	42	1,691	1,413	1	3	(D)	(D)	9	4	412	88
San Juan	-	11	-	506	-	-	-	-	-	5	-	50
San Lorenzo	44	30	3,748	840	2	-	(D)	-	13	13	393	233
San Sebastián	52	43	28,772	1,306	1	4	(D)	62	26	21	26,827	519
Santa Isabel	15	9	315,224	212,632	-	-	-	-	2	2	(D)	(D)
Toa Alta	16	23	(D)	1,449	1	3	(D)	(D)	7	4	(D)	95
Toa Baja	-	3	-	(D)	-	-	-	-	-	2	-	(D)
Trujillo Alto	8	22	(D)	(D)	1	5	(D)	(D)	3	9	(D)	(D)
Utua	139	112	55,574	(D)	12	30	(D)	538	31	55	(D)	(D)
Vega Alta	3	11	96	973	-	2	-	(D)	3	4	65	430
Vega Baja	20	10	1,184	913	-	-	-	-	5	6	170	454
Vieques	2	11	(D)	882	-	3	-	(D)	2	8	(D)	185
Villalba	23	22	(D)	(D)	1	-	(D)	-	8	6	(D)	(D)
Yabucoa	20	54	629	1,094	3	1	115	(D)	6	10	143	220
Yauco	81	24	(D)	(D)	4	2	28	(D)	6	11	48	204

2002 CENSUS OF AGRICULTURE - MUNICIPIO DATA

USDA, National Agricultural Statistics Service

Apéndice 4. Estimado del Consumo de Productos Agrícolas

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA
OFICINA DE ESTADÍSTICAS AGRÍCOLAS

ESTIMADO DEL CONSUMO DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS SELECCIONADO
Solamente frescos y congelados - base: peso en la finca
2005/2006 - 2006/2007 *

Rengón	Unidad	2005/2006	2006/2007*
Carne de Pollos 1/			
Producción Local	millones lbs.	120.3	121.8
Importación Neta	"	232.4	244.16
Total Disponible Cons.	"	352.7	366.5
Consumo Per-Cápita	libras	89.3	92.4
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	34.1	33.2
Res Y Ternera			
Producción Local	millones lbs.	21.3	23.4
Importación Neta	"	134.9	124.7
Total Disponible Cons.	"	156.2	148.1
Consumo Per-Cápita	libras	39.6	37.3
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	13.7	15.8
Carne de Cerdo			
Producción Local	millones lbs.	18.0	19.0
Importación Neta	"	174.4	168.9
Total Disponible Cons.	"	192.4	188.0
Consumo Per-Cápita	libras	48.7	47.4
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	9.3	10.1
Huevos			
Producción Local	millones docenas	16.9	15.8
Importación Neta	"	29.6	26.8
Total Disponible Cons.	"	46.4	42.7
Consumo Per-Cápita	libras	11.9	11.0
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	36.2	37.0
Café			
Producción Local	quintal	184,500	190,755
Importación Neta	"	186,434	97,622
Total Disponible Cons.	"	322,069	301,674
Consumo Per-Cápita	libras	816	761
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	57.3	63.2
Plátanos			
Producción Local	millar	429,319	395,101
Importación Neta	"	0	0
Total Disponible Cons.	"	429,319	395,101
Consumo Per-Cápita	libras	65.8	60.6
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	100	100
Guineos Verdes			
Producción Local	millar	231,329	225,436
Importación Neta	"	0	0
Total Disponible Cons.	"	231,329	225,436
Consumo Per-Cápita	libras	19.5	19.02
Producción Como % del Total Disponible	por ciento	100	100

Apéndice 5. Ingreso bruto de la agricultura de Puerto Rico

INGRESO BRUTO DE LA AGRICULTURA DE PUERTO RICO Cifras Revisadas 2005/06 y Preliminares 2006/07

Renglón	Unidad	2005/06			2006/07		
		Cantidad	Precio \$/unidad	Valor \$'000	Cantidad	Precio \$/unidad	Valor \$'000
INGRESO BRUTO TOTAL				801,561			814,220
Grupo I: Animales y sub productos;							
Total, grupo I				383,669			391,881
Leche:	miles/cilos	331,698	0.56	185,154	343,826	0.54	187,078
<i>Vaquerías 1era. Clase</i>	"	328,752	0.56	184,074	340,105	0.55	185,920
<i>Sector no-comercial</i>	"	2,946	0.37	1,080	3,721	0.31	1,158
Carne de Cerdo	miles/lbs	17,966	0.99	17,750	19,033	1.09	20,762
Carne de Res y Ternera	miles/lbs	21,352	1.39	29,681	23,434	1.38	32,313
Carne de Aves, total	miles/lbs	120,823	0.74	89,422	122,216	0.73	89,232
<i>pollos parrilleros</i>	"	120,352	0.74	89,060	121,857	0.73	88,956
<i>otras*</i>	"	471	0.77	362	359	0.77	276
Huevos	miles/doc	16,803	0.93	15,627	15,780	0.95	14,991
Otras Carnes:	miles/lbs	1,755	2.88	5,046	2,366	2.44	5,760
Conejos	miles/lbs	329	2.72	895	320	2.73	874
Cabros y ovejos	"	163	2.74	448	140	2.92	410
Otras Aves (pavos, guineas, etc.)	"	1,262	2.93	3,703	1,905	2.35	4,476
Pecuarios otros:				40,989			41,744
Caballos de carreras **	número	393	19,591.00	9,316	390	20,481.55	9,666
Caballos de paso fino**	"	306	3,719.00	1,275	301	3,562.33	1,201
Gallos de pelea	"	156,858	123.04	19,300	159,163	128.02	20,375
Conejos para crianza	"	6,805	5.42	37	5,355	5.61	30
Pequeños Rumiantes para Crianza	"	3,905	42.11	164	3,151	42.35	133
Crianza de Novillas para reemplazo	número	12,127	898.61	10,897	10,057	1,028.02	10,339

* Se refiere al sector no-comercial según se describe en la metodología interna.

** Se incluye en el valor los pagos recibidos por el agricultor por el mantenimiento de caballos en descanso.

Nota: Los precios en leche, huevos y carne se expresan en dólares por cuartillo, docenas y libra, respectivamente.

Apéndice 6. Distribución del valor de la producción agrícola

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA OFICINA DE ESTADÍSTICAS AGRICOLAS

Distribución del Valor de la Producción Agrícola 2006/07 en Orden de Importancia Económica

Renglón	Valor de la Producción Agrícola (Miles de dólares)		Por Ciento	
	Simple	Acumulado	Relativo	Acumulativo
1 Leche	187,078	187,078	25.51	25.51
2 Carne de Aves, total	89,232	276,310	12.17	37.68
3 Plátanos	76,842	353,152	10.48	48.16
4 Plantas Ornamentales	56,533	409,685	7.71	55.86
5 Café	53,471	463,155	7.29	63.16
6 Carne de Res y Ternera	32,313	495,468	4.41	67.56
7 Producción de Semillas	25,000	520,468	3.41	70.97
8 Carne de Cerdo	20,762	541,230	2.83	73.80
9 Gallos de pelea	20,375	561,605	2.78	76.58
10 Mangó de Variedad	15,286	576,891	2.08	78.67
11 Huevos	14,991	591,882	2.04	80.71
12 Guineos	13,212	605,094	1.80	82.51
13 Tomates	10,593	615,687	1.44	83.96
14 Crianza de Novillas para reemplazo	10,339	626,026	1.41	85.37
15 Caballos de carreras	9,666	635,692	1.32	86.68
16 Pescado y Marsicos	8,902	644,593	1.21	87.90
17 Forrajes	8,673	653,266	1.18	89.08
18 Crianza de Pájaros y Aves Exóticas	8,500	661,767	1.16	90.24
19 Calabazas	8,431	670,198	1.15	91.39
20 Chinas	8,091	678,288	1.10	92.49
21 Plantas aromáticas (medicinales)	5,545	683,834	0.76	93.25
22 Papayas	4,503	688,337	0.61	93.86
23 Otras Aves (pavos, guineas, etc.)	4,476	692,813	0.61	94.47
24 Otros 27 productos miscelaneos	3,939	696,752	0.54	95.01
25 Aguacates	3,801	700,553	0.52	95.53
26 Cilantrillo	3,692	704,245	0.50	96.03
27 Pimientos	3,616	707,860	0.49	96.52
28 Cebollas	2,057	709,917	0.28	96.80
29 Sandías	1,977	711,894	0.27	97.07
30 Piñas	1,710	713,605	0.23	97.31
31 Batatas	1,622	715,227	0.22	97.53
32 Ñames	1,529	716,756	0.21	97.74
33 Malangas	1,328	718,083	0.18	97.92
34 Caballos de paso fino	1,201	719,284	0.16	98.08
35 Recao	1,193	720,477	0.16	98.24
36 Cocos	1,036	721,514	0.14	98.39
37 Yautía	1,007	722,521	0.14	98.52
38 Producción Peces Trópicos y Semillas	879	723,400	0.12	98.64
39 Conejos	874	724,273	0.12	98.76
40 Maíz tierno, mazorca	860	725,133	0.12	98.88

**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA
OFICINA DE ESTADÍSTICAS AGRÍCOLAS**

Distribución del Valor de la Producción Agrícola 2006/07 en Orden de Importancia Económica

Renglón	Valor de la Producción Agrícola (Miles de dólares)		Por Ciento	
	Simple	Acumulado	Relativo	Acumulativo
41 Berenjena	703	725,836	0.10	98.98
42 Aji dulce	690	726,526	0.09	99.07
43 Apio	688	727,214	0.09	99.16
44 Habichuelas en vaina	605	727,819	0.08	99.25
45 Quenepas	575	728,394	0.08	99.32
46 Gandures	560	728,954	0.08	99.40
47 Otras Hortalizas	454	729,408	0.06	99.46
48 Cabros y ovejos	410	729,818	0.06	99.52
49 Yuca	372	730,190	0.05	99.57
50 Limones	352	730,542	0.05	99.62
51 Mangó pasote y mayaguezano	320	730,862	0.04	99.66
52 Repollo	299	731,161	0.04	99.70
53 Pepinillo	281	731,442	0.04	99.74
54 Chayote	209	731,650	0.03	99.77
55 Madera	204	731,854	0.03	99.80
56 Toronjas	175	732,029	0.02	99.82
57 Panapén	163	732,192	0.02	99.84
58 Tamarindo	149	732,341	0.02	99.86
59 Lechuga del país	140	732,481	0.02	99.88
60 Quimbombó	139	732,620	0.02	99.90
61 Pequeños Rumiantes para Crianza	133	732,754	0.02	99.92
62 Miel de abejas	117	732,870	0.02	99.93
63 Honeydew	105	732,975	0.01	99.95
64 Habichuelas tiernas S/F	57	733,032	0.01	99.96
65 Pimiento morrón	49	733,081	0.01	99.96
66 Carbón	46	733,127	0.01	99.97
67 Habichuelas en grano	44	733,172	0.01	99.98
68 Conejos para crianza	30	733,202	0.00	99.98
69 Cantaloupe	28	733,230	0.00	99.98
70 Jengibre	28	733,259	0.00	99.99
71 Guayabas	27	733,286	0.00	99.99
72 Cidras	23	733,309	0.00	99.99
73 Berro	18	733,327	0.00	100.00
74 Guanábanas	14	733,342	0.00	100.00
75 Hojas de guineos (paquetes)	6	733,348	0.00	100.00
76 Acerolas	2	733,350	0.00	100.00
77 Parchas	1	733,350	0.00	100.00
GRAN TOTAL	733,350		100.00	

Aéndice 7. Agar de hierro y triple azúcar

Triple Sugar Iron Agar • TSI Agar

Intended Use

This medium conforms with specifications of *The United States Pharmacopeia (USP)*.

Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) is used for the differentiation of gram-negative enteric bacilli based on carbohydrate fermentation and the production of hydrogen sulfide.

Summary and Explanation

TSI Agar is used for the determination of carbohydrate fermentation and hydrogen sulfide production in the identification of gram-negative bacilli.^{1,2} It is recommended in the *USP* for use in performing Microbial Limit Tests.³

Hajna developed the formulation for TSI Agar by adding sucrose to the double sugar (dextrose and lactose) formulation of Kligler Iron Agar.⁴ The addition of sucrose increased the sensitivity of the medium by facilitating the detection of sucrose-fermenting bacilli, as well as lactose and/or dextrose fermenters.

Carbohydrate fermentation is detected by the presence of gas and a visible color change (from red to yellow) of the pH indicator, phenol red. The production of hydrogen sulfide is indicated by the presence of a precipitate that blackens the medium in the butt of the tube.

Principles of the Procedure

TSI Agar contains three sugars (dextrose, lactose and sucrose), phenol red for detecting carbohydrate fermentation and ferrous ammonium sulfate for detection of hydrogen sulfide production (indicated by blackening in the butt of the tube).

Carbohydrate fermentation is indicated by the production of gas and a change in the color of the pH indicator from red to yellow. To facilitate the detection of organisms that only ferment dextrose, the dextrose concentration is one-tenth the concentration of lactose or sucrose. The small amount of acid produced in the slant of the tube during dextrose fermentation oxidizes rapidly, causing the medium to remain red or revert to an alkaline pH. In contrast, the acid reaction (yellow) is maintained in the butt of the tube because it is under lower oxygen tension.

After depletion of the limited dextrose, organisms able to do so will begin to utilize the lactose or sucrose.²

To enhance the alkaline condition of the slant, free exchange of air must be permitted by closing the tube cap loosely. If the tube is tightly closed, an acid reaction (caused solely by dextrose fermentation) will also involve the slant.

User Quality Control

NOTE: Differences in the Identity Specifications and Cultural Response testing for media offered as both **Difco™** and **BBL™** brands may reflect differences in the development and testing of media for industrial and clinical applications, per the referenced publications.

Identity Specifications

Difco™ Triple Sugar Iron Agar

Dehydrated Appearance: Pink, free-flowing, homogeneous.
 Solution: 6.5% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is red, slightly opalescent.
 Prepared Appearance: Red, slightly opalescent.
 Reaction of 6.5% Solution at 25°C: pH 7.4 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Triple Sugar Iron Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate with fresh cultures by the stab and streak method and incubate at 35 ± 2°C for 18-24 hours.

ORGANISM	ATCC*	RECOVERY	SLANT	BUTT	GAS	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	25922	Good	A	A	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Good	K	K	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Enteritidis	13076	Good	K	A	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Good	K	A	-	-

A = Acid K = Alkaline

Identity Specifications

BBL™ TSI Agar

Dehydrated Appearance: Fine, homogeneous, free of extraneous material, may contain many minute to very small tan specks.
 Solution: 5.94% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is medium to dark, red-orange to orange-red, clear to slightly hazy.
 Prepared Appearance: Medium to dark, red-orange to orange-red, clear to slightly hazy.
 Reaction of 5.94% Solution at 25°C: pH 7.3 ± 0.2

Cultural Response

BBL™ TSI Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate with fresh cultures by the stab and streak method and incubate at 35 ± 2°C for 24 hours.

ORGANISM	ATCC*	RECOVERY	SLANT	BUTT	GAS	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	25922	Good	A	A	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Good	K	K	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Typhimurium	14028	Good	K	A	+/-	+
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Good	K	A	-	-

A = Acid K = Alkaline

Formulae

Difco™ Triple Sugar Iron Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Beef Extract	3.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Proteose Peptone No. 3	5.0 g
Dextrose	1.0 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g
Ferrous Sulfate	0.2 g
Sodium Chloride	5.0 g
Sodium Thiosulfate	0.3 g
Agar	12.0 g
Phenol Red	24.0 mg

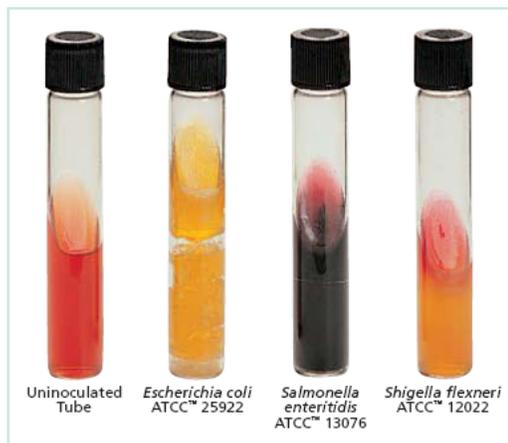
BBL™ TSI Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g
Peptic Digest of Animal Tissue	10.0 g
Dextrose	1.0 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g
Ferrous Ammonium Sulfate	0.2 g
Sodium Chloride	5.0 g
Sodium Thiosulfate	0.2 g
Agar	13.0 g
Phenol Red	25.0 mg

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend the powder in 1 L of purified water:
Difco™ Triple Sugar Iron Agar – 65 g;
BBL™ TSI Agar – 59.4 g.
Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Dispense into tubes and autoclave at 118-121°C (per label directions) for 15 minutes.
4. Cool in a slanted position so that deep butts are formed.
5. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.



Procedure

To inoculate, carefully touch only the center of an isolated colony on an enteric plated medium with a cool, sterile needle, stab into the medium in the butt of the tube, and then streak back and forth along the surface of the slant. Several colonies from each primary plate should be studied separately, since mixed infections may occur.

Incubate with caps loosened at 35°C and examine after 18-24 hours for carbohydrate fermentation, gas production and hydrogen sulfide production. Any combination of these reactions may be observed. Do not incubate longer than 24 hours because the acid reaction in the slant of lactose and sucrose fermenters may revert to an alkaline reaction.

Expected Results

Compare reactions produced by the unknown isolate with those produced by the known control organisms.

Carbohydrate fermentation is indicated by a yellow coloration of the medium. If the medium in the butt of the tube becomes yellow (acidic), but the medium in the slant becomes red (alkaline), the organism being tested only ferments dextrose (glucose).

A yellow (acidic) color in the slant and butt indicates that the organism being tested ferments dextrose, lactose and/or sucrose.

A red (alkaline) color in the slant and butt indicates that the organism being tested is a nonfermenter.

Hydrogen sulfide production results in a black precipitate in the butt of the tube.

Gas production is indicated by splitting and cracking of the medium.

For final identification, perform biochemical tests and other identification procedures with a pure culture of the organism. Consult appropriate references for further information.³⁻⁷

Limitations of the Procedure

1. Hydrogen sulfide production may be evident on Kligler Iron Agar but negative on Triple Sugar Iron Agar. Studies by Bulmash and Fulton⁸ showed that the utilization of sucrose could suppress the enzymatic mechanisms responsible for H₂S production. Padron and Dockstader⁹ found that not all H₂S-positive *Salmonella* are positive on TSI.
2. Sucrose is added to TSI to eliminate some sucrose-fermenting lactose-nonfermenters such as *Proteus* and *Citrobacter* spp.¹
3. Further biochemical tests and serological typing must be performed for definite identification and confirmation of organisms.
4. Do not use an inoculating loop to inoculate a tube of Triple Sugar Iron Agar. While stabbing the butt, mechanical splitting of the medium occurs, causing a false positive result for gas production.¹

5. A pure culture is essential when inoculating Triple Sugar Iron Agar. If inoculated with a mixed culture, irregular observations may occur.
6. Tubes should be incubated with caps loosened. This allows a free exchange of air, which is necessary to enhance the alkaline condition on the slant.¹

References

1. MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
2. Forbes, Sahm and Weissfeld. 1998. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo.
3. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2001. The United States pharmacopeia 25/The national formulary 20 – 2002. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
4. Hajna. 1945. J. Bacteriol. 49:516.
5. Ewing. 1985. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
6. Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (ed.). 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
8. Bulmash and Fulton. 1964. J. Bacteriol. 88:1813.
9. Padron and Dockstader. 1972. Appl. Microbiol. 23:1107.

Availability

Difco™ Triple Sugar Iron Agar

AOAC BAM BS10 CCAM CMPH COMPF EP MCM7 SMD
SMWW USDA USP

Cat. No. 226540 Dehydrated – 500 g

BBL™ TSI Agar

AOAC BAM BS10 CCAM CMPH COMPF EP MCM7 SMD
SMWW USDA USP

Cat. No. 211749 Dehydrated – 500 g
221038 Prepared Slants – Pkg. of 10*
221039 Prepared Slants – Ctn. of 100*

*Store at 2-8°C.

Apéndice 8. Agar hierro y lisina

Lysine Iron Agar

Intended Use

Lysine Iron Agar is used for the differentiation of enteric organisms based on their ability to decarboxylate or deaminate lysine and to form hydrogen sulfide.

Summary and Explanation

Edwards and Fife devised Lysine Iron Agar for the detection of *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae* (previously *Arizona arizonae*) cultures, especially those that ferment lactose rapidly.¹ This development followed closely the promulgation by Ewing and Edwards of a taxonomic scheme for the *Enterobacteriaceae* in which the principle division and groups within this family were defined and differentiation procedures described.² The various criteria for identification of cultures were summarized by Edwards and Ewing in their treatise on the *Enterobacteriaceae*.³ However, the taxonomy of the *Enterobacteriaceae* has changed dramatically in recent years.^{4,6}

Johnson et al. utilized Lysine Iron Agar and Kligler Iron Agar for primary differentiation of various groups of bacteria within the family *Enterobacteriaceae* and a combination of Lysine Iron Agar with Triple Sugar Iron Agar for identification of *Salmonella*, *Shigella* and *Arizona* group organisms from feces.⁷

Lysine Iron Agar aids in the differentiation of enteric bacilli on the basis of their ability to decarboxylate lysine, to deaminate lysine and to produce hydrogen sulfide. It is designed for use with other media (e.g., Triple Sugar Iron Agar) in appropriate identification schemes.

Principles of the Procedure

Dextrose serves as a source of fermentable carbohydrate. The pH indicator, bromocresol purple, is changed to a yellow color at or below pH 5.2 and is purple at or above pH 6.8.⁸ Ferric ammonium citrate and sodium thiosulfate are indicators of hydrogen sulfide formation. Lysine is the substrate for use in detecting the enzymes, lysine decarboxylase and lysine deaminase.

Cultures of enteric bacilli that produce hydrogen sulfide cause blackening of the medium due to the production of ferrous sulfides. Those that produce lysine decarboxylase produce an alkaline reaction (purple color) or neutral reaction in the butt of the medium. Organisms that deaminate the lysine cause the development of a red slant over an acid butt. Gas may be formed but its formation is often irregular or suppressed.

Formulae

Difco™ Lysine Iron Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Peptone	5.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Dextrose	1.0 g
L-Lysine HCl	10.0 g
Ferric Ammonium Citrate	0.5 g
Sodium Thiosulfate	0.04 g
Bromocresol Purple	0.02 g
Agar	15.0 g

BBL™ Lysine Iron Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Pancreatic Digest of Gelatin	5.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Dextrose	1.0 g
L-Lysine	10.0 g
Ferric Ammonium Citrate	0.5 g
Sodium Thiosulfate	0.04 g
Bromocresol Purple	0.02 g
Agar	13.5 g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend the powder in 1 L of purified water:
Difco™ Lysine Iron Agar – 34.5 g;
BBL™ Lysine Iron Agar – 33 g.
Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.

User Quality Control

NOTE: Differences in the Identity Specifications and Cultural Response testing for media offered as both **Difco™** and **BBL™** brands may reflect differences in the development and testing of media for industrial and clinical applications, per the referenced publications.

Identity Specifications

Difco™ Lysine Iron Agar

Dehydrated Appearance:	Beige to greenish beige, free flowing, homogeneous.
Solution:	3.45% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is reddish purple, slightly opalescent.
Prepared Appearance:	Purple, slightly opalescent.
Reaction of 3.45% Solution at 25°C:	pH 6.7 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Lysine Iron Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate with fresh cultures and incubate at 35 ± 2°C for 18-48 hours.

ORGANISM	ATCC™	RECOVERY	REACTION SLANT/BUTT	H ₂ S
<i>Proteus mirabilis</i>	25933	Good	Red/acid	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>arizonae</i>	13314	Good	Alkaline/alkaline	+
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Typhimurium	14028	Good	Alkaline/alkaline	+
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Good	Alkaline/acid	-

Alkaline = red purple, no change in color

Acid = yellow

Red = lysine deaminase

+ H₂S = black precipitate

- H₂S = no black precipitate



- Autoclave at 121°C for 12 minutes.
- Cool tubes in a slanted position to form slants with deep butts.
- Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Identity Specifications

BBL™ Lysine Iron Agar

Dehydrated Appearance:	Fine, homogeneous, free of extraneous material.
Solution:	3.3% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is medium to dark rose purple, clear to slightly hazy.
Prepared Appearance:	Medium to dark, rose purple, clear to slightly hazy.
Reaction of 3.3% Solution at 25°C:	pH 6.7 ± 0.2

Cultural Response

BBL™ Lysine Iron Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate with fresh cultures and incubate at 35 ± 2°C for 24 hours.

ORGANISM	ATCC™	RECOVERY	REACTION SLANT/BUTT	H ₂ S
<i>Citrobacter freundii</i>	8454	Good	K/A, w/ or w/o gas	+
<i>Escherichia coli</i>	25922	Good	K/Weak K to K, w/ or w/o gas	-
<i>Proteus vulgaris</i>	9484	Good	R/A, w/ or w/o gas	-
<i>Providencia rustigianii</i>	13159	Good	R/A, w/ or w/o gas	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>arizonae</i>	13314	Good	K/K, w/ or w/o gas	+
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Paratyphi	9150	Good	K/A, w/ or w/o gas	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Typhi	19430	Good	K/K, w/ or w/o gas	+

A = Acid (yellow)

K = Alkaline (red purple, no change in color)

R = Red (lysine deaminase)

+ H₂S = black precipitate

- H₂S = no black precipitate

Procedure

Using an inoculating needle, stab the butt twice then streak the slant with growth from a pure culture. Incubate tubes with loosened caps for 18-48 hours at 35 ± 2°C in an aerobic atmosphere.

Triple Sugar Iron Agar slants should be inoculated in parallel unless results from this medium have already been obtained to distinguish coliforms from *Shigella*, for example.

Expected Results

Lysine decarboxylation is detected in the butt by an alkaline (purple) reaction. Lysine deamination is detected by a red slant. Hydrogen sulfide production is detected by the formation of a black precipitate. A negative reaction (purple slant and yellow butt) indicates fermentation of dextrose only.⁸

Hydrogen sulfide may not be detected in this medium by organisms that are negative for lysine decarboxylase activity since acid production in the butt may suppress its formation.⁸ For this reason H₂S-producing *Proteus* species do not blacken this medium.⁸

References

1. Edwards and Fife. 1961. *Appl. Microbiol.* 9:478.
2. Ewing and Edwards. 1960. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* 10:1.
3. Edwards and Ewing. 1962. *Identification of Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.

4. Ewing. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
5. Holt, Krieg, Sneath, Slaye and Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
6. Farmer. 1999. In Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Johnson, Kunz, Barron and Ewing. 1966. *Appl. Microbiol.* 14:212.
8. MacFaddin. 1985. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Availability

Difco™ Lysine Iron Agar

AOAC BAM BS10 CCAM CMPH MCM7 SMD SMWW USDA

Cat. No. 284920 Dehydrated – 500 g

BBL™ Lysine Iron Agar

AOAC BAM BS10 CCAM CMPH MCM7 SMD SMWW USDA

Cat. No. 211363 Dehydrated – 500 g
220952 Prepared Slants – Pkg. of 10*
220953 Prepared Slants – Ctn. of 100*

*Store at 2-8°C.