

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS

“Prevalencia, similitud genética y perfil de resistencia antimicrobiana de serovares de *Salmonella* en cerdos”

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

ALBERTO GARFIO ROMERO

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. GABRIELA SILVA HIDALGO**

**CO-DIRECTOR
DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO**

Culiacán, Sinaloa, México Enero de 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

A mis padres: Jesús Garfio Soto † y María Romero Ortiz; así como a mis padres académicos Martín López Valenzuela y Gabriela Silva Hidalgo, por su paciencia y tiempo dedicados a mi persona para llevar a término este proyecto.

Hermanos: Jesús Manuel Garfio Romero, Katy Cecilia Garfio Romero, Samuel Garfio Medina, por su acompañamiento a lo largo del programa de Doctorado y por escuchar mis ideas y siempre autorizarlas sin cuestionar.

Esposa e hijo: Laura Fernanda Hernández García y el pequeño Santiago, que llegaron en la etapa final de este proyecto para cerrarlo con gran satisfacción.

Amigos: no pueden faltar mis grandes amigos que me han visto desde el ingreso al Doctorado, Margarita del Socorro Dávila Paredes y Elvic Noguera Corona.

A los responsables y fundadores del Centro de Investigación Epidemiológica de Sinaloa: Dra. Aida Lourdes Simental Ocegüera y MC. Saúl Beltrán Fernández.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por el financiamiento otorgado durante el desarrollo del proyecto.

Asesores: Dr. Javier Alonso Romo Rubio, Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado, Dr. Héctor Samuel López, Dr. Felipe Juárez Barranco, por sus excelentes comentarios y sugerencias para la mejora de la redacción del documento de tesis.

A las Granjas de cerdos y sus propietarios “La Huerta” y “Recoveco”, MC. Héctor Raúl Güemes Gaxiola y director del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 133 (CBTA 133), respectivamente; porque sin estos espacios la investigación no hubiera sido posible.

Al Dr. Juan Manuel Romo Valdez por su apoyo incondicional en el manejo de los cerdos que se realizó al interior de la granja la Huerta.

A los Tesistas de Licenciatura (Levi David Castillo Montoya y Diana Cecilia Zazueta Alvarado) y Tesista de Maestría (Diana Zuleika Velázquez Valdez, Mayra Gisell López Salazar), que en su momento participaron y apoyaron en las actividades del proyecto. A todos aquellos animales que participaron con la colaboración sus muestras para el procesamiento y posterior aislamiento de *Salmonella*.

A la Carnicería Caimanero, que de una forma amable accedieron a donar un fragmento de íleon y linfonodos mesentéricos después del sacrificio de los cerdos.

A la planta de procesamiento Tipo Inspección Federal (TIF 99, FAPSA y asociados S.A. de C.V.), por permitirme el acceder a sus instalaciones y poder recolectar las muestras necesarias.

Al Centro de Investigación Epidemiológica de Sinaloa (CIES) del Hospital General de Culiacán “Bernardo J. Gastélum”, por su apoyo para realizar estancia de capacitación para el desarrollo de la técnica electroforesis en campo pulsado.

CONTENIDO**PÁGINA**

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
1.2.1. Generalidades de <i>Salmonella</i>	2
1.2.2. Taxonomía de <i>Salmonella</i>	3
1.2.3. Transmisión y fuentes de infección.....	4
1.2.4. Patogenia y factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	5
1.2.5. <i>Salmonella</i> en los cerdos.....	8
1.2.6. Resistencia de <i>Salmonella</i> a fármacos	9
1.2.7. Métodos de Diagnóstico	11
1.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa	13
1.2.9. Serotipificación	13
1.2.10. Esquema de Kauffmann-White	16
1.2.12. Electroforesis en gel de campo pulsado	17
1.3. Conclusiones	19
CAPÍTULO 2. Similitud genética de serovares de <i>Salmonella</i> aisladas de granjas de cerdos en Sinaloa, México	21
2.1 RESUMEN	21
2.2 ABSTRACT	22
2.3 INTRODUCCIÓN	23
2.4 MATERIAL Y MÉTODOS	24
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
2.6 CONCLUSIONES.....	30
2.7 LITERATURA CITADA.....	30
CAPÍTULO 3. Prevalencia, serovares, y perfiles resistencia a antibióticos en cepas <i>Salmonella</i> aisladas de una granja de cerdos de ciclo completo en Sinaloa, México	34
3.1 RESUMEN	34

3.2 ABSTRACT	35
3.3 INTRODUCCIÓN	35
3.3 MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.5 CONCLUSIONES.....	43
3.6 LITERATURA CITADA.....	44
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES	46
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA	47
ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Titulo	Página
CAPÍTULO 1		
1	Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> spp.....	8
2	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Salmonella</i>	12
CAPÍTULO 2		
1	Frecuencia de serovares de <i>Salmonella</i> y fuentes de aislamiento.....	28
CAPÍTULO 3		
1	Prevalencia de aislamientos de <i>Salmonella</i> multirresistentes encontrados durante el muestreo.....	41
2	Serovares de <i>Salmonella</i> aislados de heces de cerdos y cucarachas dentro de la granja y de tejidos obtenidos durante el sacrificio en un Rastro Tipo Inspección Federal.....	42
3	Resistencia antimicrobiana de los serovares de <i>Salmonella</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
CAPÍTULO 1		
1	Clasificación del género <i>Salmonella</i>	5
2	Modelo esquemático de infección por <i>Salmonella</i> enterica.....	7
CAPÍTULO 2		
1	Análisis de PFGE.....	29
CAPÍTULO 3		
1	Amplificación del gen <i>invA</i>	41

RESUMEN

Prevalencia, similitud genética y perfil de resistencia antimicrobiana de serovares de *Salmonella* en cerdos

Alberto Garfio Romero

Salmonella es un género de bacterias patógenas, importantes como agentes causales de enfermedades gastroentéricas por consumo de alimentos contaminados y una de las fuentes de contaminación es la especie porcina y sus derivados. Con el objetivo de determinar la prevalencia, similitud genética y perfil de resistencia antimicrobiana de serovares de *Salmonella* en cerdos, procedentes de dos granjas ubicadas en la zona centro del Estado de Sinaloa, se realizaron dos estudios. En el primer estudio se analizaron 340 muestras de heces, colectadas en cerdos de diferentes edades y estados fisiológicos, de dos granjas ubicadas en la zona centro del Estado de Sinaloa, así como de tejido de íleon colectadas en rastro TIF, para determinar la similitud genética de los serovares de *Salmonella*. La determinación de la similitud genética de los serovares se realizó mediante digestión con la enzima de restricción XbaI y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Los serovares Anatum, Seftenberg, Untipable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Weltevreden, Serrakunda, Muenchen, Grupo C2, Grupo E1 (E2-E4), Grupo E1, Grupo C1 y Grupo F fueron aislados de 32 de las muestras analizadas. El serovar Anatum, el de mayor frecuencia en los aislamientos, tuvo una similitud genética de 87.5 - 100%, Grupo E1 87.5 -100%, Serrekunda 88.9 -100%, Muenchen 100%, Senftenberg 96.6% y Newport 75.9%; con un coeficiente de Jaccard superior a 0.75 en el análisis PFGE y, por lo tanto, se consideraron clones bacterianos. En el segundo estudio se analizaron 227 muestras de heces y tejido de cerdos para determinar la prevalencia, serovares y perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella*; en 21 de las muestras analizadas se aisló *Salmonella* y se identificaron diez serovares diferentes (*S. Anatum*, *S. Group E1*, *S. Seftenberg*, *S. Untypable*, *S. Javiana*, *S. Tokoin*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Group C2* y *S. Group C1*); la frecuencia observada de los serovares *S. Anatum*, *S. Group E1* y *S. Seftenberg* fue del 42.85, 14.2 y 9.52%, respectivamente. La prevalencia del género *Salmonella* fue del 9.25%. El 76.1% de los serovares presentó multiresistencia a ampicilina, carbencilina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, netilmicina y gentamicina. Los resultados indican que el porcentaje de similitud genética es alto, lo que sugiere una posible fuente de contaminación cruzada en las unidades de producción porcina analizadas. Aunque se observó una baja prevalencia (9.34%) de *Salmonella*, la multiresistencia a antimicrobianos está presente en los serovares identificados.

Palabras clave: Cerdos, Prevalencia, Resistencia antimicrobiana, *Salmonella*, Serovares

ABSTRACT

Prevalence, genetic similarity and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars in pigs

Alberto Garfio Romero

Salmonella is a genus of pathogenic bacteria, important as causal agents of gastroenteric diseases due to consumption of contaminated food and one of the sources of contamination is the porcine species and its derivatives. With the objective of determining the prevalence, genetic similarity and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars in pigs, from two farms located in the central area of the State of Sinaloa, two studies were carried out. In the first study, 340 fecal samples were analyzed, collected from pigs of different ages and physiological states, from two farms located in the central area of the State of Sinaloa, as well as ileum tissue collected in TIF slaughterhouses, to determine genetic similarity of *Salmonella* serovars. Determination of the genetic similarity of the serovars was performed by digestion with the restriction enzyme XbaI and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Anatum, Seftenberg, Untypable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Weltevreden, Serrakunda, Muenchen, Group C2, Group E1 (E2-E4), Group E1, Group C1 and Group F serovars were isolated from 32 of the samples analyzed. The Anatum serovar, the most frequent in the isolates, had a genetic similarity of 87,5 - 100%, Group E1 87,5 - 100%, Serrekunda 88,9 - 100%, Muenchen 100%, Senftenberg 96,6% and Newport 75,9%; with a Jaccard coefficient greater than 0.75 in the PFGE analysis and, therefore, were considered bacterial clones. In the second study, 227 samples of feces and tissue from pigs were analyzed to determine the prevalence, serovars, and profiles of resistance to antibiotics in *Salmonella* strains; *Salmonella* was isolated in 21 of the samples analyzed and ten different serovars were identified (S. Anatum, S. Group E1, S. Seftenberg, S. Untypable, S. Javiana, S. Tokoin, S. Newport, S. Typhimurium, S. Group C2 and S. Group C1); the observed frequency of serovars S. Anatum, S. Group E1, and S. Seftenberg was 42.85, 14.2, and 9.52%, respectively. The prevalence of the genus *Salmonella* was 9.25%. 76.1% of the serovars presented multiresistance to ampicillin, carbencillin, chloramphenicol, sulfamethoxazol-trimethoprim, netilmicin and gentamicin. The results indicate that the percentage of genetic similarity is high, which indicates a possible source of cross contamination in the swine production units analyzed. Although a low prevalence (9.34%) of *Salmonella* was observed, multiresistance to antimicrobials is present in the identified serovars.

Keywords: Pigs, Prevalence, Antimicrobial resistance, *Salmonella*, Serovars

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

Salmonella no tifoidea se considera un problema de salud pública, es una de las causas más importantes de gastroenteritis en los seres humanos causado por el consumo de productos de origen porcino, bovino y aviar (Zaidi *et al.*, 2006; Arcos-Ávila *et al.*, 2013; Awoke *et al.*, 2018; EFSA, 2023). *Salmonella* spp. puede considerarse como un componente del microbioma intestinal del cerdo; éstos, suelen ser portadores asintomáticos, excretando el patógeno de forma intermitente o cuando están estresados (Simons *et al.*, 2015). Sin embargo, los brotes de salmonelosis asociados con el consumo de carne de cerdo han colocado a los cerdos y sus productos como la segunda fuente más importante de infección humana (Pieres *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2020). Las infecciones por *Salmonella* en cerdos producen grandes pérdidas económicas por impactar sobre índices productivos como la mortalidad, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia, además de constituir una de las enfermedades zoonóticas más importantes del mundo (Awoke *et al.*, 2018). La electroforesis en gel de campo pulsado PFGE (por sus siglas en inglés Pulsed-Field Gel Electrophoresis), ha demostrado ser una técnica altamente discriminatoria y es utilizada con frecuencia en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos como *Salmonella entérica*; mediante el análisis de los patrones, utilizando un software, se han podido determinar las similitudes génicas entre los aislamientos, lo que ha permitido inferir si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva (Pires *et al.*, 2014; Magistrali *et al.*, 2008; De Busser *et al.*, 2011; Kich *et al.*, 2011; Gomes-Neves *et al.*, 2012; Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017). Durante el periodo 2003-2005 Zaidi *et al.* (2006) colectaron muestras fecales de pacientes con diarrea y muestras de carne de pollo, cerdo y res, aislando *Salmonella* no-Typhi; los serovares encontrados fueron Typhimurium y Enteritidis; la primera se encontró en los tres tipos de animales estudiados y sus carnes crudas, siendo el cerdo el principal reservorio, seguido por carne de bovino y pollo. En un estudio realizado en China, Li *et al.* (2014) aislaron *Salmonella* de carne cruda de cerdo. La mayor prevalencia se

encontró en la carne de cerdo vendida a menudeo en supermercados; los serovares más prevalentes en los aislamientos fueron: Derby, Typhimurium, Meleagridis, Anatum y Londres; además, estos serovares revelaron que más del 80% eran multirresistentes a más de dos antimicrobianos. La mayor resistencia fue a tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim y ácido nalidíxico. Shivaramu *et al.* (2013) aislaron *Salmonella* de muestras tomadas de todas las etapas de producción y durante el procesamiento de cerdos en rastro; la prevalencia fue significativamente mayor en linfonodos mesentéricos extraídos de canales de cerdos provenientes de sistemas de producción convencionales que en aquellos de canales de cerdos procedentes de sistemas de producción libres de antimicrobianos. En dicho estudio se observaron 24 serovares diferentes, los más prevalentes fueron: Typhimurium, Anatum, Infantis y Derby. Todos exhibieron alta resistencia a tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim y estreptomina. Los resultados obtenidos en estudios previos permiten plantear la hipótesis, que los serovares de *Salmonella*, prevalentes en los cerdos de las granjas porcinas del centro de Sinaloa, muestran similitud genética y resistencia a los antimicrobianos; por lo que el objetivo del estudio fue determinar la prevalencia, similitud genética y perfil de resistencia antimicrobiana de serovares de *Salmonella* en cerdos, procedentes de dos granjas ubicadas en la zona centro del Estado de Sinaloa.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1. Generalidades de *Salmonella*

Salmonella es una bacteria que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, son bacilos anaeróbicos facultativos, Gram negativos, generalmente móviles, no forman esporas y poseen flagelos peritricos (Damián, 2019); su tamaño oscila entre 0.7–1.5 × 2.0–5.0 µm (Gast y Porter, 2020). Son móviles, con excepción de algunos serovares, como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Jajere, 2019). La temperatura óptima de crecimiento para *Salmonella* spp. va de los 35 a 37°C, con un periodo de incubación de 18 a 24 horas (Solarte, 2017); su crecimiento se ve disminuido a -15°C y temperaturas mayores a 49.5°C y el crecimiento se da en un pH que va de 3.8 a 9.5,

siendo el óptimo de 7-7.5 (Zabaleta, 2015). Sobreviven durante largos periodos de tiempo en materia fecal y durante más de 20 semanas en sedimento (barro, lodo, fango, etc.); también logran sobrevivir en canales y estanques durante años al igual que en harinas de carne y en la circulación sanguínea; muestra un comportamiento estacional, particularmente cuando concurren variaciones de temperaturas y precipitaciones elevadas, como es el caso de las regiones tropicales y subtropicales donde las condiciones ambientales son ideales para el establecimiento de la bacteria (Simental y Martínez-Urtaza, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Otro factor importante en la persistencia ambiental de *Salmonella* es su resistencia a antibióticos, lo que aumenta el riesgo de infecciones en seres humanos y animales debido a la aparición de clones multiresistentes, dificultando aún más el tratamiento relacionado con enfermedades y brotes (Angulo *et al.*, 2004; Zaidi *et al.*, 2012). Las infecciones por *Salmonella* son causadas por el consumo de alimentos de origen animal contaminados con esta bacteria y pueden provocar enteritis aguda o bien fiebre tifoidea sistémica (Zaidi *et al.*, 2006; Arcos-Ávila *et al.*, 2013). *Salmonella* ha sido aislada de distintos orígenes, tanto de animales domésticos, salvajes, roedores, aves, reptiles e incluso insectos, los que constituyen un inmenso reservorio para *Salmonella*; generalmente éstos no manifiestan signos de enfermedad, por lo que se favorece la circulación de esta bacteria en ciclos contaminantes (Gaspar, 2018). Se ha observado que los roedores y las aves silvestres, representan un papel importante en la diseminación inter-especies (Melo, 2015). Además, la capacidad de *Salmonella* para formar biopelículas en distintos escenarios facilita su adherencia para sobrevivir en superficies vivas o inertes, un paso crucial para infectar un nuevo hospedero (Donlan y Costerton, 2002; Ledebor y Jones, 2005; Steenackers *et al.*, 2012).

1.2.2. Taxonomía de *Salmonella*

El género *Salmonella* consta sólo de dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; *Salmonella enterica* se subdivide en 6 subespecies: I *enterica*, II *salamae*, IIIa *arizonae*, IIIb *diarizonae*, IV *houtenae* y VI *indica* (Tindall *et al.*, 2005; Sanderson y Nair, 2013). El símbolo romano V se reserva para la especie de *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* está asociada con infecciones en el hombre

y animales de sangre caliente (Sanderson y Nair, 2013; Tindall *et al.*, 2005; Jacob *et al.*, 2020). La salmonelosis en seres humanos y animales también puede clasificarse en dos grandes grupos: fiebre enterica (tifoidea) y salmonelosis no-Typhi (Langridge *et al.*, 2008). La enfermedad puede manifestarse de cinco maneras: fiebre enterica, gastroenteritis, bacteriemia, infección focal extra-intestinal y un estado de portador (ver Figura 1; Langridge *et al.*, 2008). El esquema de Kauffman-White, publicado por primera vez en 1929, en la actualidad divide a *Salmonella* en más de 2,600 serovares con base en su reacción serológica al lipopolisacárido o antígeno (O), flagellar (H) y antígeno capsular (Vi) (Grimont y Weill, 2007). Al igual que muchas otras enfermedades infecciosas, el curso y resultado de la infección depende de varios factores, incluyendo la dosis de inoculación, el estado inmune del hospedero (edad, enfermedad subyacente) y el fondo genético del patógeno infeccioso (por ejemplo, los factores de virulencia en el patógeno). (Langridge *et al.*, 2008).

1.2.3. Transmisión y fuentes de infección

La Salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comúnmente reportadas en todo el mundo (Cruz, 2017). Las vías de transmisión de *Salmonella* incluyen contacto directo, contaminación ambiental (heces) y, el más común, consumo de alimento de origen animal contaminado (Cruz, 2017). Los principales alimentos implicados en causar salmonelosis humana son la carne cruda bovina y de cerdo, carne de ave de corral y los huevos, siendo estos dos últimos la principal fuente de contaminación de *Salmonella*; sin embargo, los brotes de salmonelosis humana asociados con el consumo de carne de cerdo han colocado a los cerdos y sus productos como la segunda fuente más importante de infección humana (Pires *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019).

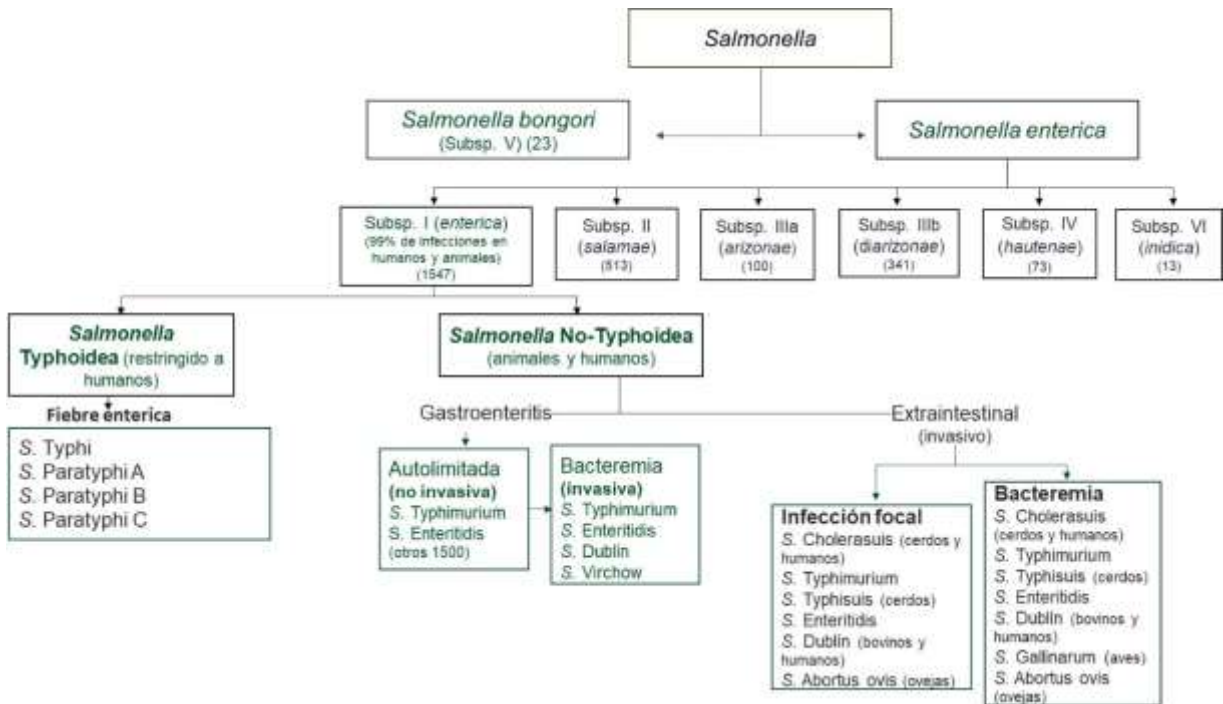


Figura 1. Clasificación del género *Salmonella*. Los números entre paréntesis indican el número total de serovar incluidos en cada subespecie (Guibourdenche *et al.*, 2010).

1.2.4. Patogenia y factores de virulencia de *Salmonella*

Las infecciones por *S. enterica* se adquieren usualmente a través de la vía oral. Para que *Salmonella* cause daño en el organismo se requiere de un inóculo de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) (Solarte, 2017); una proporción del inóculo sobrevive al pH ácido del estómago (Sabag, 2017) mediante un complejo sistema adaptativo llamado “respuesta de tolerancia ácida” (Leiva *et al.*, 2018). La evidencia en modelos murinos de infecciones sistémicas indica que algunos de los microorganismos ingeridos invaden los enterocitos y las células M de la mucosa y submucosa intestinal. *S. enterica* es fagocitada por macrófagos residentes, se multiplica y evoca inflamación; ésta, media la liberación de prostaglandinas, las que activan el AMPc y produce diarrea (Vázquez *et al.*, 1999; Leiva *et al.*, 2018; Muriel, 2019). Los macrófagos son las células blanco de *Salmonella*, ya que dentro de ellos la bacteria se establece en una vacuola, de esta manera *Salmonella* evade la actividad lítica de los componentes lisosomales, se multiplica y propaga en el tejido intestinal o el resto de órganos del hospedador, ocasionando una infección local o sistémica

(Barreto *et al.*, 2016). Los macrófagos mueren por piroptosis vía Caspasa 1 y la bacteria, ahora libre de su ambiente intracelular, se disemina en el torrente sanguíneo, entrando directamente a ellos o bien a través de los vasos linfáticos y de los linfonodos mesentéricos (LnMs) (Figura 2). En la sangre *S. enterica* es reconocida como una bacteria extracelular o bien asociada a leucocitos CD18⁺ (Silva *et al.*, 2012). *S. enterica* también puede alcanzar la submucosa intestinal a través de las células dendríticas, las cuales emiten prolongaciones a través de las uniones celulares de los enterocitos, y de esta manera diseminarse a sitios distantes y ocasionar infección sistémica (Rescigno *et al.*, 2001). Cuando *Salmonella* ya se ha unido al epitelio intestinal, ésta expresa el sistema de secreción de proteínas de tipo III (SST3) mediada por la isla de patogenicidad de *Salmonella*-1 (SPI-1) (Mcquate *et al.*, 2017); este complejo se encarga de translocar las proteínas efectoras en el citosol de las células eucariotas, ocasionando cambios en el citoesqueleto, permitiendo el ingreso de la bacteria (Velasco *et al.*, 2019). El SST3 juega un papel importante tanto para la colonización intestinal, como para el hígado y el bazo (Bumann y Schothorst, 2017). *Salmonella* invade y se multiplica dentro de los macrófagos y células dendríticas (CD) para poder atravesar la barrera epitelial y así colonizar el tejido linfoide y los linfonodos mesentéricos (Barreto *et al.*, 2016). Es mediante la formación de un segundo SST3, mediado por la isla de patogenicidad de *Salmonella* (SPI-2), que *Salmonella* puede sobrevivir y replicarse dentro de estas células (Velasco *et al.*, 2019).

Dentro de los factores de virulencia se encuentran las SPI, de las cuales se han identificado más de 23 (Sabag, 2017), siendo cinco las más comunes para todos los serovares de *S. enterica* (Barreto *et al.*, 2016); éstas están formadas por un grupo de genes que codifican los factores de virulencia (ver Cuadro 1; Herrera y Jabib, 2015), así pueden colonizar de manera eficiente al huésped (Aleman, 2019).

Los plásmidos de virulencia en *Salmonella* son elementos extracromosómicos de ADN; éstos son específicos de cada serovar (Gast y Porter, 2020). La importancia de su expresión radica en que son necesarios para la multiplicación de la bacteria en el sistema reticuloendotelial, en hígado y bazo (Jajere, 2019).

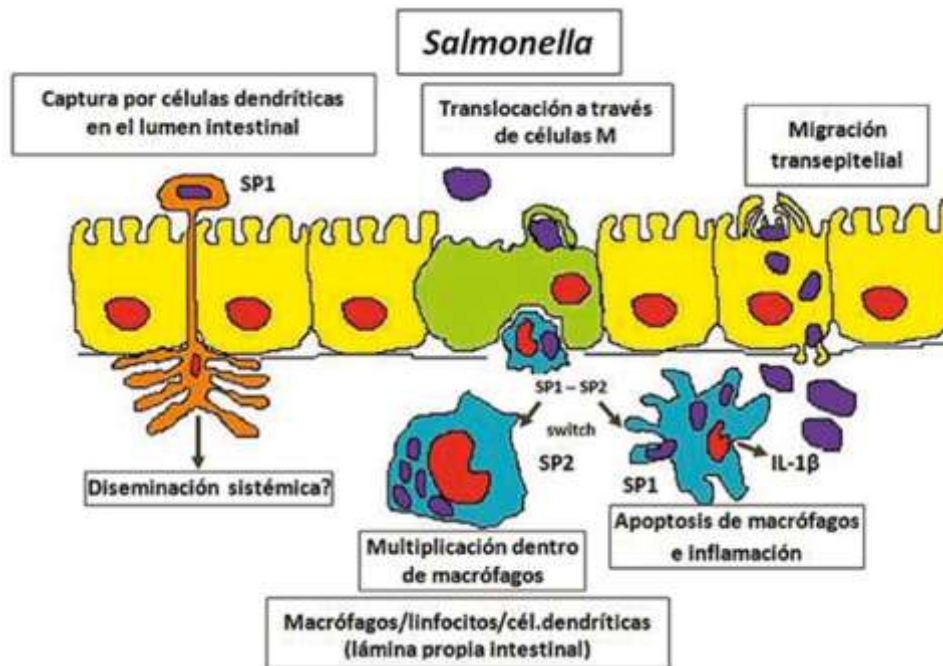


Figura 2. Modelo esquemático de infección por *Salmonella enterica*. Tomado de: Silva, Gabriela & López-Moreno, Héctor. (2012). Genes involucrados en la patogénesis, persistencia y excreción de *Salmonella* en modelos animales. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2. 107. SPI-1; SPI-2; IL-1 β : Interleucina 1-beta.

La *Salmonella* posee fimbrias encargadas de la colonización en el epitelio intestinal; se ha demostrado que éstas contribuyen a la interacción con los macrófagos, la persistencia intestinal y la formación de biopelículas (Dufresne *et al.*, 2018). Están compuestas por una mezcla heterogénea de proteínas; la expresión de las fimbrias por la *Salmonella* se describió por primera vez a inicios del siglo XX (Duguid y Gillies, 1958).

El flagelo es el encargado de la motilidad y quimiotaxis de la bacteria (Aleman, 2019); además, es un fuerte inductor de inflamación (Dos Santos *et al.*, 2019). Entre otros factores de virulencia están los polisacáridos de la superficie, que participan en la persistencia de *Salmonella* a nivel del tracto intestinal e induce una respuesta inflamatoria local (Jajere, 2019; Santos, 2016). Los flagelos son importantes en las bacterias y son fácilmente reconocidos por el sistema inmune adaptativo del hospedero (Sbrogio-Almeida *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Islas de patogenicidad de *Salmonella* spp.

SPI	Segmento de ADN (kb)	No. de genes	Función
SPI-1	35-40	31	Translocación de moléculas en el citoplasma
SPI-2	40	32	Supervivencia y replicación de la bacteria, intracelular de fagocitos y células epiteliales
SPI-3	17		Supervivencia intracelular en macrófagos
SPI-4	27	18	Secreción de toxinas
SPI-5	7.5		Reacción inflamatoria intestinal

Fuente: Herrera y Jabib (2015).

1.2.5. *Salmonella* en los cerdos

El consumo de carne de cerdo se ha incrementado en México, debido a que su precio es competitivo respecto a las carnes de ave o bovino. En el año 2017, el consumo per cápita de carne de cerdo en México fue de 19 kg (CMC, 2017); para el 2018 se estimó que México ocuparía el 10^{mo} lugar en la producción mundial de carne de cerdo, con una aportación de 1.5 millones de toneladas; en este mismo año, se pronosticó que la producción mundial de carne de cerdo crecería en un 2.3% con una producción de 113.5 millones de toneladas. En México los principales Estados productores de cerdo son Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán y Veracruz, entidades donde se concentraría el 69.4% de la producción nacional (CIMA, 2018). Desde hace décadas se conoce la presencia de *Salmonella* en esta especie (Vico *et al.*, 2020). Los cerdos suelen ser portadores asintomáticos, que excretan el patógeno de forma intermitente o cuando están estresados (Ortega, 2019). Todos los grupos de edad son susceptibles a infecciones por *Salmonella*; se ha observado mayor frecuencia en cerdos después del destete, y entre dos a cuatro meses de edad (Salas, 2016). Las manifestaciones clínicas de los cerdos con salmonelosis son: fiebre, diarrea, anorexia, cianosis en cola, orejas y hocico, en ocasiones convulsiones terminales y disnea; cuando los animales sobreviven pueden ser portadores asintomáticos debido a que la bacteria se encuentra a nivel de linfonodos mesentéricos y vesícula biliar (Bellido, 2019). Se ha determinado que el transporte desde la granja al matadero es una fuente de contaminación de

Salmonella, ya que cerdos enfermos o asintomáticos, incrementan su defecación debido al estrés al que están sometidos, y de esa forma propagan la infección a otros cerdos que se encuentran sanos (Calvete *et al.*, 2015).

1.2.6. Resistencia de *Salmonella* a fármacos

La capacidad que tiene la bacteria para desarrollar mecanismos de defensa contra la acción de los antimicrobianos es lo que se conoce como “resistencia bacteriana” y ésta puede ser innata o adquirida (Serra, 2017). La resistencia innata es una propiedad específica, ya sea de género o especie de las bacterias (Van Duijkeren *et al.*, 2017); la resistencia adquirida puede ser debido a mutaciones en el cromosoma bacteriano o al adquirir nuevo material genético proveniente de otras bacterias (Chávez, 2020).

El estudio de la resistencia mostrada por *Salmonella* a diferentes antimicrobianos ha cobrado importancia en los últimos años, debido a las complicaciones en el tratamiento de las infecciones causadas por cepas resistentes (Vega-Sánchez *et al.*, 2020).

Según Van Duijkeren *et al.* (2017), existen 4 mecanismos de resistencia básicos:

1) Inactivación enzimática o modificación del antimicrobiano. Este mecanismo se ha observado en la resistencia frente a β -lactámicos, en el cual la bacteria adquiere genes que codifican para enzimas betalactamasas mediadas por la utilización de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) (Marston *et al.*, 2016).

2) Sistema de bombas de eflujo activo. Se observa en la resistencia frente a las tetraciclinas en el cual los niveles de toxicidad del antimicrobiano se ven reducidos; codifican esta resistencia los genes *tet* (Van Duijkeren *et al.*, 2017).

3) Cambios en el sitio diana de acción del antimicrobiano. Este mecanismo ha sido observado en la resistencia a fluoroquinolonas y consiste en una combinación de mutaciones en los genes de ADN girasa y topoisomerasa IV, codificadas por los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, por lo cual el antimicrobiano no puede actuar sobre la bacteria (McDermott *et al.*, 2018; Pribul *et al.*, 2017).

4) Cambios en la permeabilidad de la membrana externa. La permeabilidad de la membrana puede ser alterada principalmente por cambios producidos en las porinas; la función de las porinas es permitir el paso de sustancias hidrofílicas mediante la formación de canales (Santajit y Indrawattana, 2016). Dentro de estas sustancias se

incluyen a los antibióticos, siendo los β -lactámicos, fluoroquinolonas, carbapenémicos y cefalosporinas, los principales afectados por dicha modificación (Troncoso *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en Brasil se siguieron seis lotes de lechones, producidos en diferentes granjas, desde el nacimiento hasta su sacrificio; las muestras se sometieron a detección de *Salmonella* spp. El 10.2% de las muestras analizadas dieron positivas a *Salmonella* spp. y se observaron altas tasas de resistencia contra tetraciclina (83.8%), cloranfenicol (54.3%) y trimetoprim-sulfametoxazol (33.3%); además, se informó de aislamientos resistentes a seis de los antimicrobianos probados: amikacina, furazolidona, cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, (Dos Santos *et al.*, 2019).

En un estudio, llevado a cabo en Argentina en cerdos de engorda (linfonodos mesentéricos), para estimar la prevalencia y resistencia de *Salmonella* spp. a antibióticos, se determinó una prevalencia de 41.5%, además de sugerir que el factor de riesgo asociado con la infección de *Salmonella* spp. es el periodo previo al sacrificio, así como el tiempo y distancia de traslado al rastro. La resistencia antimicrobiana encontrada fue del 86% a aminopenicilinas, 80% a tetraciclinas, 52% a anfenicoles, 52% a fluorquinolonas y quinolonas, 24% a sulfonamidas y 4% a aminoglicosidos (Vico *et al.*, 2020).

En un estudio realizado en el sur de China, donde se aisló *Salmonella* spp. de muestras de carne de cerdo, obtenidas de mercados libres, se observó que el 82.2% de los aislamientos fue resistente al menos a un agente antimicrobiano y el 25.2% fueron resistentes a más de tres antimicrobianos; la mayor resistencia fue a la tetraciclina (66.3%), seguida de ampicilina (39.9%), trimetoprim-sulfametoxazol (31.3%) y ácido nalidíxico (30.1%) (Li *et al.*, 2014).

En Carolina del Norte informan un porcentaje bajo de aislamientos de *Salmonella* spp. de dos granjas con sistemas de producción distintos (tecnificado y traspatio); las frecuencias de resistencia antimicrobiana más altas se exhibieron para tetraciclina (71%), sulfisoxazol (42%) y estreptomina (17%) (Shivaramu *et al.*, 2013). Además de aislar a la bacteria de todas las etapas de sacrificio, la prevalencia de *Salmonella* spp.

fue significativamente mayor en linfonodos mesentéricos de cerdos provenientes de un sistema de producción de traspatio (Shivaramu *et al.*, 2013).

En un estudio de asociación de genotipos y perfiles de resistencia, realizado en Taiwán, Kuo *et al.* (2014) observaron que el 96% de los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron multirresistentes: 44% a cefotaxima, 34% ceftazidima, 51% ácido nalidíxico, 21% ciprofloxacino, 62% gentamicina, 94% ampicilina, 85% cloranfenicol, 69% estreptomina, 97% sulfametoxazol, 92% tetraciclina, 75% trimetoprim/sulfametoxazol. Además, el 48% de los aislamientos realizados tenía patrones de electroforesis de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés Pulsed-Field Gel Electrophoresis) con aislamientos de *Salmonella* spp. en seres humanos, indicando que los cerdos son uno de los principales reservorios de salmonelosis humana en este país (Kuo *et al.*, 2014). Sinwat *et al.* (2015), en un estudio realizado en Tailandia en muestras tomadas de carne de cerdo, pollo y seres humanos, observaron que el 95.8% de los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron multiresistentes a distintos antimicrobianos: sulfametoxazol (96.4%), estreptomina (93.2%), espectinomicina (76.5%), tetraciclina (73.3%), ampicilina (70.1%) y trimetoprim (60.2%). Vega-Sánchez *et al.* (2020) observaron que *Salmonella* mostró una resistencia del 100% a los aminoglucósidos, tetraciclinas (73.7%) y ciprofloxacina (44.7%). El 66.6% de las cepas evaluadas fueron resistentes a tres y cuatro clases diferentes de antimicrobianos. Además, indicaron que el aislamiento de *Salmonella* es menor (1.3%) en muestras obtenidas de rastros que implementaron y cumplieron con los procesos sanitarios de obtención de la carne, en tanto que en aquellos cuyas prácticas de higiene fueron menos rigurosas los aislamientos se observaron en el 46.8% de las muestras utilizadas para el aislamiento de *Salmonella*.

1.2.7. Métodos de Diagnóstico

El método para el diagnóstico de *Salmonella*, usado en la actualidad, es el cultivo bacteriano (norma ISO 6579-1:2017) (ISO, 2017); dura de 5 a 7 días y está compuesto de dos fases. La primera fase es de preenriquecimiento, que incluye un medio no selectivo, con el objetivo de incrementar el crecimiento bacteriano (Esteve, 2017); en tanto, la segunda fase de enriquecimiento es en un medio selectivo, cuyo objetivo es

reducir el crecimiento de la biota que compite con *Salmonella*. Luego el microorganismo es sembrado en un medio selectivo sólido, y aquellas colonias, que se sospecha que son de *Salmonella*, son confirmadas mediante pruebas bioquímicas (Cuadro 2) morfológicas y serológicas (Ruiz *et al.*, 2018).

También existen los llamados “métodos alternativos”, que son mucho más rápidos que el método tradicional; sin embargo, sólo son aceptados aquellos que puedan ser validados (Correa, 2018). Dentro de los anteriores, los más usados son la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica de inmunocromatográfica, principalmente en muestras de alimentos, tejidos y materia fecal (Ruiz *et al.*, 2018). Entre las pruebas diagnósticas disponibles para detectar la presencia de salmonelosis en cerdos, destaca PCR, ELISA y cultivos en medios selectivos y diferenciales; éstas constituyen los métodos más usados para la detección de la salmonelosis en granjas porcícolas, cuya prevalencia está asociada al desarrollo de resistencia microbiana (Ruiz *et al.*, 2018; Frutos y López, 2018; Gonzalez *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella*

Pruebas bioquímicas	Resultado
TSI	K/A + Gas+ H ₂ S S: positivo
SIM	I: negativo M: positivo
LIA	Positivo
Producción de urea	Negativo
Citrato	Positivo*

Tomado y modificado de Japón (2019). Aislamiento y Serotipificación de *Salmonella* en canales de pollo en percha en la ciudad de Quito. Universidad Central del Ecuador. TSI: Fermentación de azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa, producción de gas y H₂S); SIM: Formación de ácido sulfhídrico, producción de indol y motilidad; LIA: Lisina descarboxilasa. *Depende del serovar.

1.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa

Los inicios de la utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se remontan a 1971, cuando se describió por vez primera un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro* (Luigi *et al.*, 2015). Sin embargo, este ensayo no recibió mucha atención y la autoría de la PCR fue atribuida 12 años después a Kary Mullis perteneciente a la *Cetus Corporation*, California S.A (Luigi *et al.*, 2015). La PCR representa una valiosa alternativa para el estudio de los genes a nivel mundial. En *Salmonella* puede utilizarse para amplificar el gen *invA*, que codifica el factor de virulencia ligado a la invasión (Luigi *et al.*, 2015).

La identificación rápida para determinar las fuentes primarias de contaminación bacteriana es importante para la mejora de la salud pública (Majchrzak *et al.*, 2014); en tal sentido, la técnica de PCR es rápida y sensible, debido a su capacidad para amplificar un fragmento de ADN 10^7 veces en dos a tres horas (Diaz, 2016). Los fragmentos de ADN una vez amplificados y separados mediante electroforesis representan una huella genómica que permite la discriminación de subespecies y delimitación de cepas bacterianas (Alvarado, 2017).

1.2.9. Serotipificación

El esquema de Kauffmann-White-Le Minor permite caracterizar más de 2,600 serovares, reconociendo 46 antígenos "O" y 119 antígenos "H"; este método es popular, ya que se ha empleado en estudios epidemiológicos, permitiendo la identificación de los serovares prevalentes en cada región, así como, la etiología de infecciones, tanto en poblaciones humanas como animales (Andreu *et al.*, 2016). El principio de la identificación serológica de *Salmonella* implica la mezcla del organismo sospechoso con antisuero que contiene anticuerpos específicos de *Salmonella*; las bacterias aglutinarán en presencia del antisuero homólogo, indicando la presencia del antígeno (Porwollik *et al.*, 2014). Los antisueros polivalentes "O" y "H" de *Salmonella* se preparan en conejos, usando cepas de referencia, según los métodos recomendados por la OMS y se absorben para eliminar los anticuerpos de reacción cruzada (Porwollik *et al.*, 2014).

La serotipificación es una herramienta importante para la identificación de las cepas de *Salmonella* a nivel de serovares que suelen variar en su rango de patogenicidad y animales que afecta; además, suele ser muy útil en investigaciones epidemiológicas, ya que indica la prevalencia de un serovar en distintas zonas geográficas (Alfaro, 2018; Japón, 2019). El conocimiento de los serovares circulantes en un país permite saber cuáles son los reservorios o los alimentos que sirven de vehículo en las toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella*, la implicación de cada serovar en la gravedad de la infección, la distribución de resistencias, la evolución de cada uno de ellos, la detección de brotes y la cuantificación de infecciones esporádicas (Vugia *et al.*, 2014).

Entre los principales serovares de *Salmonella* más prevalentes en cerdos, reportados en América del Norte, Europa, Asia y Oceanía están *S. Derby* y *S. Typhimurium*. En África el serovar *S. Hadar* ha sido el más aislado; mientras que en América Latina el más descrito es *S. Meleagridis*, junto con *S. Anatum* y *S. Agona* (Ferrari *et al.*, 2019). En Alemania, en los años 2013-2014, se reportó un brote de salmonelosis humana asociada con el consumo de carne de cerdo, causada en un 90% por *S. Muenchen* (Schielke *et al.*, 2017).

En los cerdos la salmonelosis es causada principalmente por *Salmonella Choleraesuis* (variante *Kunzendorf*), debido a su capacidad de supervivencia y persistencia en las heces durante 20 semanas; con menor frecuencia es provocada por los serovares *Typhimurium*, *Derby* y *Agona*. Estos microorganismos son desactivados por medio de la luz solar, calor y desinfectantes a base de cloro, yodo y fenol; pero sobreviven cómodamente por meses, o varios años, en condiciones de congelación y/o desecación en sustratos orgánicos (Arcos-Ávila *et al.*, 2013). En un estudio realizado en Taiwán, durante el periodo del 2004 a 2012, se identificaron 12 serovares a partir de 110 aislamientos de *Salmonella* provenientes de muestras tomadas en cerdos; los serovares observados fueron *Typhimurim*, *Stanley*, *Newport*, *Albany*, *Derby*, *Schwarzengrund*, *Choleraesuis*, *Hadar*, *Anatum*, *Livingstone*, *London* y *Brunei*; mostrando una similitud genética del 44% respecto de aislamientos clínicos obtenidos de humanos (Kuo *et al.*, 2014). En el sur de China, Li *et al.* (2014) observaron la presencia de 14 serovares diferentes de *Salmonella*, obtenidas de muestras de carne de cerdo obtenidas de mercados libres; el serovar más prevalente fue *Derby* (47.9%),

seguido de Typhimurium (10.4%), Meleagridis (9.2%), Anatum (8.6%) y London (6.7%). Los serovares con menor prevalencia fueron Agona, Infantis, Newport, Chester, Muenster, Give, Limete, Virchow y Schwarzengrund. En Italia, Piras *et al.* (2014) observaron la prevalencia de los serovares Anatum (71.8%), Derby (33.3%), Bredeney (5%) y Holcomb (2.5%), a partir de aislamientos de muestras de heces tomadas de lechones, cerdo de engorda, así como de linfonodos mesentéricos y colon. En la Ciudad de México, se aisló *Salmonella* a partir de muestras de carnes molidas de diferentes especies animales que se expenden en mercado sobre ruedas, entre las que destacó la carne de cerdo. Los serovares observados fueron Anatum, Newport, Typhimurium y Derby; la mayor frecuencia fue de Anatum y Newport. Todos los serovares presentaron resistencia de 100% a carbenicilina, ampicilina, cloranfenicol, cefotaxima y perfloxacina (Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017). Mirko *et al.* (2017) observaron que los serovares de *Salmonella* más prevalentes, en muestras de hisopos y contenido de íleon obtenidas de cerdos después del sacrificio, fueron: S. Derby, S. Infantis y S. Typhimurium, todos ellos con una alta similitud génica. En España se aisló *Salmonella* a partir de muestras de heces tomadas en cerdos de engorda, así como de hígado, colon y linfonodos mesentéricos. No se detectó la presencia de *Salmonella* en muestras tomadas de lechones. El serovar más prevalente fue S. Anatum, seguido de S. Rissen, S. Derby y S. Typhimurium monofásico (Fois *et al.*, 2017). Lan *et al.* (2018) observaron la presencia de los serovares S. Typhimurium, S. Anatum, S. Seftenberg, S. Paratyphi A, S. Paratyphi B, S. Montevideo y S. Sainpaul; los genes *invA* y *sopB* se encontraron en todos los serovares que fueron aislados de muestras fecales obtenidas de cerdos, en granjas y rastros, en provincias del sur de Vietnam. En un estudio de seguimiento de seis lotes de lechones de diferentes granjas hasta su sacrificio, realizado en el sur de Brasil, se observaron los siguientes serovares: Typhimurium, Mbandaka, Panama, Derby, Agona, Give, Worthington, Meleagridis, Poona, Typhimurium variante monofásica 4,5,12:i:- y Typhimurium variante monofásica 4,5,12:-:1,2; siendo el serovar Typhimurium el más prevalente (Dos Santos *et al.*, 2019). En Brasil se observó la presencia de los serovares de Agona, Senftenberg y Schwarzengrund, en muestras de materia fecal de cerdas ubicadas en diferentes áreas de la granja (Santana *et al.*, 2020). En Argentina se identificaron los serovares

Anatum, Typhimurium, Panama, subesp I 1,3,19: z10:-, monofásica I 4,5,12: i:-, monofásica I 4,5,12: d:-, Lexington, Westhampton, Derby, Adelaide, Bredeney, Corvallis, Javiana, Minnesota y Mbandaka; siendo los serovares Anatum y Typhimurium los más prevalentes. También Vico *et al.* (2020) aislaron *Salmonella* a partir de muestras de linfonodo mesentéricos de cerdos. En Brasil se obtuvieron aislamientos de *Salmonella* de diferentes muestras clínicas, que incluyeron cerdos en lactancia, crecimiento y engorda; los serovares más prevalentes fueron Typhimurium variante monofásica 4,5,12:i:- aislados de muestras de heces tomadas de cerdos con enteritis; el otro serovar fue, Cholerae suis, aislado de muestras tomadas en cerdos con cuadro clínico septicémico; también se observó la presencia, en menor porcentaje, del serovar Newport, Rissen, Panama, Anatum, Infantis, London, Olso, Derby y Bovismorbificans (Meneguzzi *et al.*, 2021). En otro estudio reciente, realizado en España, se observó la presencia de *Salmonella* en muestras de heces tomadas en lechones, así como del piso de diferentes áreas dentro de la granja. Los serovares identificados fueron Rissen, Anatum, Brandenburg, Derby, Kapemba, Goldcoast, Kedougou, Ohio, Agona y Typhimurium variante monofásica 4,5,12:i:- (Bernad-Roche *et al.*, 2021).

1.2.10. Esquema de Kauffmann-White

La primera publicación del esquema de Kauffmann-White enumeró 44 serovares (Subcomité de *Salmonella*, 1934). Cuando F. Kauffmann se retiró (1964) el esquema contenía 958 serovares, cuando L. Le Minor se retiró, había 2267 serovares y cuando se retira M.Y. Popoff, había 2555 serovares. Dado que L. Le Minor describió la mayoría de los serovares conocidos actualmente, se propuso designar la lista de fórmulas antigénicas (anteriormente conocida como “esquema Kauffmann-White”) como esquema White-Kauffmann-Le Minor (Grimont y Weill, 2007).

La segunda causa más común de intoxicación alimentaria bacteriana es por *Salmonella* (Chattaway *et al.*, 2021). Se utilizan anticuerpos específicos que reconocen la pared celular (O) y los antígenos de flagelos (H) de fase 1 y fase 2. La combinación de O: H1: H2 se conoce como la fórmula antigénica y cada combinación única recibe un nombre de serovar (Chattaway *et al.*, 2021).

La mayoría de los serovares de *Salmonella* son móviles, los flagelos pueden ser codificados por dos genes diferentes de flagelina; la expresión de *fljC* y *fljB* se regula mediante un mecanismo llamado “variación de fase”. Aunque la mayoría de serovares son bifásicos existen unos pocos que son monofásicos y pueden expresar la fase 1 o la fase 2 (Bisio, 2017). La variación de fase es un proceso reversible, que se encuentra asociado a un interruptor reversible (on/off), en el cual se expresa una fase que reprime la otra (Naberhaus, 2019). Los serovares monofásicos de *Salmonella* pueden haberse originado de un serovar ancestral que no desarrolló el mecanismo para cambiar de fase flagelar 1 a 2 o no puede expresar esta segunda fase; o puede existir mutación de un serovar difásico (Naberhaus, 2019).

1.2.12. Electroforesis en gel de campo pulsado

La PFGE es una técnica altamente discriminatoria y utilizada con frecuencia en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos como *Salmonella* spp. (Olsen *et al.*, 1994). La PFGE ha sido útil y precisa para rastrear fuentes de contaminación, permitiendo la identificación de la persistencia, contaminación cruzada y distribución de *Salmonella* en la producción porcina y el procesamiento de carne de cerdo (Magistrali *et al.*, 2008; De Busser *et al.*, 2011; Kich *et al.*, 2011; Gomes-Neves *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2018). Varios protocolos de PFGE están estandarizados para patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos y se han aplicado a una red nacional de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos (Swaminathan *et al.*, 2001) y una red de vigilancia mundial ampliada (Swaminathan *et al.*, 2006). Esta técnica se utiliza para reconocer brotes de infección, detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección, reconocer las cepas particularmente virulentas para el seguimiento de los programas de vacunación (Oliva y Bean, 1999). Mediante el análisis de los patrones, utilizando el software Unweighted Pair Group Method with Arithmetic meanII (UPGMA), se han podido determinar las similitudes génicas entre los aislamientos, lo que permite determinar si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva (Tenover *et al.*, 1995; Nascentes *et al.*, 2012). La enzima, XbaI, seguida de ApaI ofrecen los mejores resultados para diferenciar los aislamientos,

agrupándolos por linajes y mostrando variaciones intraserovar (Nascentes *et al.*, 2012). Los resultados de estos análisis en varios países de América Latina se analizan utilizando PulseNet; esto asegura la comparación de patrones PFGE en condiciones equivalentes (Cardozo-Bernal *et al.*, 2012).

En Buenos Aires, Argentina, se aislaron de muestras tomadas en cerdos para sacrificio las cepas *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Derby* y *S. Orion*, en las cuales se observó multiresistencia (Ibar, 2017). Los resultados del PFGE-XbaI determinaron 30 perfiles diferentes, sin embargo, no se estableció correlación entre resistencia antimicrobiana y perfil genético (Ibar, 2017). Se encontró el mismo subtipo genético de *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Derby*, *S. Anatum* y *S. Adelaide*, circulando en cerdos y casos de salmonelosis en humanos (Ibar, 2017).

En un estudio realizado en Brasil, se observó que *S. Typhimurium* y su variante monofásica 4, 5, 12: i: presentaban perfiles genéticos idénticos por PFGE (Dos Santos *et al.*, 2019), además de ser el serovar más prevalente en diferentes áreas de la granja.

En un estudio realizado en Túnez durante 16 años, en el que se recuperaron 175 aislados de *S. Enteritidis* de seres humanos, animales y muestras de brotes transmitidos por alimentos, que fueron sometidos a PFGE, mostraron similitud genética, lo que sugiere que los aislados de *S. Enteritidis* estaban estrechamente relacionados (Ksibi *et al.*, 2021). El aislamiento de *S. Agona* de muestras de heces de cerdas preñadas y de búfalos lactantes, muestran un patrón de PFGE indistinguible; por lo que se considera, que ambas especies pueden actuar como reservorios asintomáticos de *Salmonella*, contribuyendo a la transmisión de esta enfermedad a otras especies y también al ser humano (Santana *et al.*, 2020). *S. Derby*, aislada de muestras de hisopos tomadas a cerdos en la cadena de sacrificio en un rastro de Servia mostró una similitud génica de 98% (Mirko *et al.*, 2017). El serovar *Typhimurium*, aislado de cerdos de diferentes lotes, presentó perfiles idénticos por PFGE, sugiriendo que el ambiente de las granjas y el suministro de alimento pueden ser fuentes para la diseminación de *Salmonella* spp. a lo largo de la línea de producción (Dos Santos *et al.*, 2019).

Meneguzzi *et al.* (2021) observaron una homología mayor a 90% por PFGE en aislamientos de *S. Typhimurium* y cepas de *S. Anatum*, aisladas de diferentes granjas;

también se observó una alta similitud génica del serovar Derby, aisladas de cerdos, con más de 300 días de diferencia. Bernad-Roche *et al.* (2021) observaron una similitud génica mayor a 90% en todos los serovares Rissen, obtenidos de diferentes áreas e incluso de diferentes granjas de cerdos; el análisis PFGE del serovar 4, [5], 12: i: -, mostró una similitud génica mayor o igual a 90%; el mismo comportamiento se informó para el serovar Dervy. Kuo *et al.* (2014) observaron que los serovares *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* y *S. Schwarzengrund*, que causaron graves infecciones en cerdos también fueron capaces de causar infecciones en humanos. Estos autores, indicaron que, de 110 aislamientos, a partir de muestras tomadas en cerdos, el 44% compartió patrones de PFGE con los aislamientos humanos.

1.3. Conclusiones

Salmonella es una bacteria que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, son bacilos anaeróbicos facultativos, Gram negativos, generalmente móviles, no forman esporas y poseen flagelos peritricos. Esta bacteria ha sido aislada de distintos orígenes, tanto de animales domésticos o salvajes, de roedores, aves, reptiles e incluso insectos, los que constituyen un inmenso reservorio para *Salmonella*; generalmente los animales portadores de *Salmonella* no manifiestan signos de enfermedad, por lo que se favorece la circulación de esta bacteria en ciclos contaminantes. *Salmonella* es una bacteria con multiresistencia a antibióticos, lo que aumenta el riesgo de infecciones en seres humanos y animales debido a la aparición de clones multiresistentes, dificultando aún más el tratamiento relacionado con enfermedades y brotes. Los cerdos son uno de los principales reservorios de salmonelosis humana.

Entre las pruebas diagnósticas disponibles para detectar la presencia de salmonelosis en cerdos, destacan la PCR, ELISA, PFGE y cultivos en medios selectivos y diferenciales; éstas constituyen los métodos más usados para la detección de la salmonelosis en granjas porcícolas, cuya prevalencia está asociada al desarrollo de resistencia microbiana.

La identificación rápida para determinar las fuentes primarias de contaminación bacteriana es importante para la mejora de la salud pública; en tal sentido, la técnica

de PCR es rápida y sensible, debido a su capacidad para amplificar un fragmento de ADN 10^7 veces en dos a tres horas. Los fragmentos de ADN representan una huella genómica que permite la discriminación de subespecies y delimitación de cepas bacterianas.

La PFGE es una técnica altamente discriminatoria y utilizada con frecuencia en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos como *Salmonella* spp. La PFGE ha sido útil y precisa para rastrear fuentes de contaminación, permitiendo la identificación de la persistencia, contaminación cruzada y distribución de *Salmonella* en la producción porcina y el procesamiento de carne de cerdo. Esta técnica se utiliza para reconocer brotes de infección, detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección, reconocer las cepas particularmente virulentas para el seguimiento de los programas de vacunación. Mediante el análisis de los patrones, utilizando el software Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA), se han podido determinar las similitudes génicas entre los aislamientos, lo que permite determinar si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva.

La serotipificación es una herramienta importante para la identificación de las cepas de *Salmonella* a nivel de serovares, que suelen variar en su rango de patogenicidad y animales que afecta; además, suele ser muy útil en investigaciones epidemiológicas, ya que indica la prevalencia de un serovar en distintas zonas geográficas. El conocimiento de los serovares circulantes en un país permite saber cuáles son los reservorios o los alimentos que sirven de vehículo en las toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella*, la implicación de cada serovar en la gravedad de la infección, la distribución de resistencias, la evolución de cada uno de ellos, la detección de brotes y la cuantificación de infecciones esporádicas. Los serovares de *Salmonella* más prevalentes en cerdos, reportados en América Latina son Meleagridis, Anatum y Agona.

CAPÍTULO 2. Similitud genética de serovares de *Salmonella* aisladas de granjas de cerdos en Sinaloa, México

Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2022; 12:1-11. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.28>
Artículo Original. Recibido: 20/12/2021. Aceptado:24/09/2022. Publicado: 24/10/2022. Clave:
e2021-87. <https://www.youtube.com/watch?v=3e06v5chrV8>

Garfio-Romero Alberto^{1ID}, Silva-Hidalgo Gabriela^{1ID}, Rendón-Maldonado José^{2ID}, Simental Lourdes^{3ID}, Beltrán-Fernández Saúl^{4ID}, Romo-Rubio Javier^{*5ID}

¹Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, Boulevard San Ángel S/N, Fracc. San Benito, 80246 Culiacán, Sinaloa, México. ²Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria 80040, Culiacán, Sinaloa, México. ³Inoquotech SA de CV, Federalismo 44911-5 Residencial Palmillas 80150 Culiacán, Sinaloa INO 181005BZ3. ⁴Centro de Investigación Epidemiológica de Sinaloa del Hospital General de Culiacán “Bernardo J. Gastélum”, Juan Aldama S/N esq. Estado de Nayarit, Colonia Rosales, Culiacán, Sinaloa, C.P 80230. ⁵Universidad Politécnica del Mar y la Sierra, La Cruz, Elota, Sinaloa, México y Granja porcina “La Huerta”, Sindicatura de Culiacancito, Municipio de Culiacán Rosales, Sinaloa. *Autor para correspondencia: Javier Romo-Rubio, Boulevard San Ángel S/N, Fracc. San Benito, 80246 Culiacán, Sinaloa, México. E-mail: alberto.garfio@uas.edu.mx, gabsilhid@uas.edu.mx, jgrendonm@uas.edu.mx, lourdessimental@inoquotech.com, beltransaul1968@gmail.com, romo60@uas.edu.mx

2.1 RESUMEN

Salmonella es un importante patógeno como agente causante de enfermedades gastroentéricas por consumo de alimentos contaminados. Para determinar la similitud genética de los serovares de Salmonella, se recolectaron 340 muestras de heces y tejido de íleon de cerdos de diferentes edades y estados fisiológicos de dos granjas ubicadas en la zona centro del Estado de Sinaloa; se recogieron muestras de íleon de mataderos TIF. La similitud génica de los serovares se realizó mediante digestión con la enzima de restricción XbaI y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Salmonella y los serovares Anatum, Seftenberg, Untipable, Javiana, Tokoin, Newport,

Typhimurium, Weltevreden, Serrakunda, Muenchen, Grupo C2, Grupo E1 (E2-E4), Grupo E1, Grupo C1 y Grupo F fueron aislados de 32 de las muestras analizadas. El serovar Anatum, el más frecuentemente aislado, tuvo una similitud genética de 87.5 - 100%, Grupo E1 87.5 -100%, Serrekunda 88.9 -100%, Muenchen 100%, Senftenberg 96,6% y Newport 75,9%; éstos, tuvieron un coeficiente de Jaccard superior a 0.75 en el análisis PFGE y, por lo tanto, se consideraron clones bacterianos. En conclusión, el porcentaje de similitud genética observado fue alto, lo que indica una posible fuente de contaminación cruzada en las unidades de producción porcina analizadas.

2.2 ABSTRACT

Salmonella is an important pathogen as a causative agent of gastroenteric diseases by consumption of contaminated food. To determine the genetic similarity of *Salmonella* serovars, 340 samples of feces and ileum tissue were collected from pigs of different ages and physiological stages from two farms located in the central zone of the State of Sinaloa; ileum samples were collected from FIT slaughterhouses. Gene similarity of serovars was performed by digestion with the restriction enzyme *Xba*I and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *Salmonella* and serovars Anatum, Seftenberg, Untipable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Weltevreden, Serrakunda, Muenchen, Group C2, Group E1 (E2-E4), Group E1, Group C1 and Group F were isolated from 32 of the samples analyzed. The most frequently isolated serovar Anatum had a genetic similarity of 87,5 - 100%, Group E1 87,5 -100%, Serrekunda 88,9 -100%, Muenchen 100%, Senftenberg 96,6% and Newport 75,9%; these had a Jaccard coefficient greater than 0.75 in the PFGE analysis and were therefore considered bacterial clones. In conclusion, the percentage of genetic similarity observed was high, indicating a possible source of cross-contamination in the swine production units analyzed.

Keywords: Anatum, pigs, PFGE, *Salmonella*, serovars.

2.3 INTRODUCCIÓN

Salmonella no tifoidea se considera un problema de salud pública importante, la creciente relevancia de los cerdos como reservorios de *Salmonella* spp. ha llevado a varios países a establecer programas de vigilancia y control para combatir la infección y reducir los riesgos para la salud pública (Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017). Hasta el momento se conocen alrededor de 2600 serovares de esta bacteria y éstos suelen encontrarse a nivel de tracto gastrointestinal en especies animales tanto domésticas como silvestres e incluso en el ser humano (Herikstad *et al.*, 2002). Los cerdos suelen ser portadores asintomáticos, que excretan el patógeno de forma intermitente o cuando están estresados (Simons *et al.*, 2015). Los brotes de salmonelosis asociados con el consumo de carne de cerdo han colocado a este animal y sus productos como la segunda fuente más importante de infección humana (Pires *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2020).

La electroforesis en campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una técnica altamente discriminatoria y es utilizada con frecuencia en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos como *Salmonella* spp. (Pires *et al.*, 2014). La PFGE ha sido útil y precisa para rastrear fuentes de contaminación, permitiendo la identificación de la persistencia, contaminación cruzada y distribución de *Salmonella* en la producción porcina y el procesamiento de carne de cerdo (Magistrali *et al.*, 2008; De Busser *et al.*, 2011; Kich *et al.*, 2011; Gomes-Neves *et al.*, 2012; Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017). Varios protocolos de PFGE están estandarizados para patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos, mismos que forman parte de la red nacional de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos (Swaminathan *et al.*, 2001). La enzima, *Xba*I, seguida de *Ap*aI ofrecen los mejores resultados para diferenciar los aislamientos, agrupándolos por linajes y mostrando variaciones intraserovar. Los resultados de estos análisis, en varios países de América Latina, se analizan utilizando PulseNet; esto asegura la comparación de patrones PFGE en condiciones equivalentes (Cardozo-Bernal *et al.*, 2012). Los serovares *S. Derby* y *S. Typhimurium* se han aislado con mayor frecuencia en cerdos de América del Norte, Europa, Asia y Oceanía; en África *S. Hadar* y en América Latina *S. Meleagridis*, *S. Anatum* y *S. Agona* (Dos Santos *et al.*, 2019). En un

estudio realizado en Brasil se sugirió que *S. Typhimurium* y su variante monofásica 4, 5, 12: i: presentaban perfiles genéticos idénticos al hacer la determinación de similitud genética por PFGE (Dos Santos *et al.*, 2019); siendo, además, el serovar con mayor prevalencia en diferentes áreas de la granja. En México, la serotipificación de 358 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de carne molida de cerdo, pollo y res, arrojó que los serovar más frecuentes son *S. Anatum*, *S. Newport* y *S. Typhimurium* (Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017).

El objetivo del estudio fue determinar la similitud genética de serovares de *Salmonella*, aislados de muestras de heces colectadas en dos granjas de ciclo completo ubicadas en la zona centro del Estado de Sinaloa y de muestras de íleon tomadas en un rastro tipo inspección federal (TIF).

2.4 MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de muestras y aislamiento de *Salmonella*

Las muestras de heces fueron tomadas en la granja porcina “La Huerta” y la granja porcina “Recoveco”, ubicadas en la sindicatura de Culiacancito, Municipio de Culiacán Rosales, y en el pueblo de Recoveco, Municipio de Mocorito, Sinaloa, respectivamente.

Se recolectaron aproximadamente 40 g de materia fecal de cerdas en el área de gestación; posteriormente (10 días después), se recolectó materia fecal de las mismas cerdas en el área de maternidad, así como de sus crías (lechones). A la misma cohorte de cerdos se le tomó muestras de heces durante su permanencia en el área de iniciación y en el área de engorda. Además, se recolectaron muestras de fauna nociva (materia fecal de roedores y cucarachas), agua de charcas de enfriamiento y agua de desecho, después del lavado de corraletas. También se recolectaron muestras fecales obtenidas del remolque durante el transporte al rastro y antes del sacrificio (muestras fecales obtenidas de corral de descanso). Durante el proceso de sacrificio en el Rastro Tipo Inspección Federal (TIF 99. FAPSA y asociados S. A de C.V., Carretera Culiacán - El Dorado, km 12.5), se recolectaron aproximadamente 100 g de tejido de intestino delgado de la porción del íleon. Las muestras fueron depositadas en recipientes estériles, previamente etiquetados.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Para el aislamiento de *Salmonella*, se pesó 1 g de materia fecal y de tejido intestinal, incubándose para el pre-enriquecimiento durante 48 h a 37°C en Caldo de Tetrionato (Difco^{MR}). Posteriormente, se inocularon 100 µl de caldo tetrionato en caldo Rappaport Vassiliadis (Difco^{MR}) para enriquecimiento selectivo y se incubaron durante 24 h a 42°C. Finalmente, se inocularon las muestras en agar Xilosa Lisina Tergitol-4 (XLT4 Difco^{MR}), seguido de un período de incubación de 24 h a 37°C.

Extracción de ADN para análisis de similitud génica

La preparación de las muestras se realizó a partir de cultivos frescos en agar soya tripticaseína (Difco^{MR}) incubados a 37°C por 24h; posteriormente, se mezclaron colonias bacterianas en 2 mL de buffer de suspensión celular hasta lograr una densidad óptica de 0.52. Se mantuvo la temperatura a -20°C, se le añadió 20 µl de proteinasa K y se incubó a 42°C en baño maría por 10 minutos. A la par se preparó agarosa certificada al 1% y se mezclaron 400 µl de agarosa con 400 µl de la suspensión celular con proteinasa K; después se depositó la suspensión en moldes para plugs, por triplicado, hasta que polimerizó. Cada triplicado de plugs se depositó en tubos falcon con 5 mL de buffer de lisis celular y 50 µl de proteinasa K, incubándose durante 18 horas a 54°C. Posteriormente, se lavaron los plugs con agua estéril y buffer tris -ácido etilendiaminotetraacético (TE)- y, finalmente, los plugs se almacenaron en viales de polipropileno previamente rotulados con 5 mL de buffer TE.

Análisis de similitud génica

La similitud génica de los serovares se realizó mediante digestión de la enzima de restricción *Xba*I y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), utilizando el sistema CHEF-DR III BIORAD en el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de Sinaloa (Culiacán, Sinaloa, México), certificado por la Organización Mundial de la Salud y la Red Mundial de Infecciones Transmitidas por Alimentos. Las condiciones de corrida electroforética utilizadas fueron: voltaje a 6 V/cm, ángulo 120°, tiempo de pulso inicial 2.2 segundos, tiempo de pulso final 63.8 segundos, miliamperio (mA) inicial 132,

temperatura 14°C durante 19 h. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se capturaron las imágenes de los geles con un fotodocumentador Alpha imagen. El análisis de los geles se realizó mediante el programa GelCompar II en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). A los aislamientos se les asignó un tipo de PFGE diferente cuando se detectó diferencia genética. El análisis de conglomerados se realizó mediante el coeficiente de Jaccard y el método de grupos de pares no ponderados con promedios aritméticos.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron 340 muestras de cerdos sin semiología digestiva compatible con salmonelosis. En 32 de las muestras tomadas se aisló *Salmonella* y se identificaron los siguientes serovares: *S. Anatum*, *S. Seftenberg*, *S. Untipable*, *S. Javiana*, *S. Tokoin*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden*, *S. Serrakunda*, *S. Muenchen*, S. Grupo C2, S. Grupo E1 (E2-E4), S. Grupo E1, S. Grupo C1, S. Grupo F. (Cuadro 1). Se identificó similitud génica de serovares de *Salmonella* aislados de muestras de heces en las diferentes áreas productivas, de ambas granjas y en distintos tiempos de muestreo. Los serovares de *S. Anatum*, aislados de heces de cerdo en el área de engorda y de tejido (íleon), tienen una similitud génica del 100%; los serovares de *S. Anatum* aislados de heces de lechones y ratas, tomadas en el área de maternidad, tejido (íleon) y heces de cerdos obtenidas del pasillo de traslado, tuvieron una similitud de 96.3 a 97%. Los serovares *S. Anatum*, aislados de heces de cerdos del área de gestación y agua de desecho obtenida de la fosa común en la granja “Recoveco”, tuvieron una similitud génica de 86.7%. Cinco serovares del S. Grupo E1, dos serovares *S. Newport*, dos serovares *S. Seftenberg* y dos serovares *S. Serrakuda*, mostraron una similitud génica y un índice de Jaccard mayor de 0.75. *S. Muenchen* compartió una similitud génica del 100% con el serovar del S. Grupo C2, mientras que el serovar *S. Tokoin* tuvo una similitud génica de 97% con *Salmonella* del S. Grupo C1; el resto de los serovares analizados mostraron una similitud génica menor al 75% (Figura 1).

[Hung-Chih et al. \(2014\)](#) informaron de 12 serovares; de los cuales, los cinco más comunes fueron *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Derby*, *S. Livingstone* var. 14+ y

S. Schwarzengrund, que representaron el 84% de los aislamientos en todos los cerdos; de éstos, el 44% tenían patrones de PFGE estrechamente relacionados con aislamientos en humanos. En el presente estudio, el serovar con mayor frecuencia de aislamiento fue *S. Anatum*, con una similitud genética entre ellos del 86 y 100%. [Dos Santos et al. \(2019\)](#), en un estudio realizado en el sur de Brasil, identificaron *S. Typhimurium* en muestras de heces colectadas de diferentes áreas productivas dentro de la granja y en diferentes granjas, con perfiles electroforéticos idénticos (100% de similitud); estos resultados concuerdan con los obtenidos, en los cuales se obtuvieron perfiles con alta similitud genética, que rebasa el coeficiente de Jaccard de 0.75.

En el caso particular del serovar *S. Anatum*, aislado con mayor frecuencia tanto en muestras de heces como de tejido intestinal de la región del Íleon, se observó una similitud genética 86.7 – 100%. En el resto de los serovares analizados la similitud genética también fue alta: *S. Grupo E1: E2-E4* y *S. Grupo E1*, con similitud entre el 87.5 -100%, *S. Serrekunda* entre 88.9 -100%, *S. Muenchen* y *S. Grupo C2* del 100%, *S. Senftenberg* del 96.6% y *S. Newport* del 75.9%; por lo que pueden considerarse idénticos. Lo anterior, podría indicar una posible contaminación cruzada o contaminación a partir de la misma fuente dentro de la granja. La contaminación cruzada en el interior de las granjas representa un desafío en el control y erradicación de la bacteria. Esto podría potenciar la dispersión dentro de la granja poniendo en riesgo la salud de los animales y por tratarse de una enfermedad zoonótica, se pone en riesgo, también, la salud humana a través del consumo de productos de origen animal contaminados.

[Kureljusic et al. \(2017\)](#) aislaron los serovares *S. Derby*, *S. Infantis* y *S. Typhimurium* de cerdos en el área de sacrificio, observando una similitud genética del 98 - 100 % para *S. Dervi*, siendo además el que se aisló con mayor frecuencia; también indicaron que los serovares *S. Infantis* y *S. Typhimurium* presentaron una alta similitud genética. En la presente investigación el serovar *S. Anatum*, aislado de muestras de íleon obtenidas de la planta de procesamiento del rastro TIF 99, presentó una similitud genética del 95%; también se aislaron los serovares *S. Grupo E1 (E2-E4)*, *S. Grupo E1*, *S. Seftenberg*, *S. Typhimurium* y *S. Grupo C1*. En el caso del serovar *S. Seftenberg*, aislado de muestras de íleon y heces del área de maternidad, se observó una similitud genética

del 96.6%; estos resultados son similares a los informados por [Santana et al. \(2020\)](#) quienes señalaron una similitud génica para el serovar *S. Seftenberg* aislado de heces de cerdas en el área de gestación, área de lactación y lechones en el área de destete.

Cuadro 1. Frecuencia de serovares de *Salmonella* y fuentes de aislamiento

Serovar	Área de aislamiento	Porcentaje de aislamiento (%)
Anatum	Maternidad (heces de lechones) Heces de roedores Engorda (heces) Íleon	31.3
Seftenberg	Maternidad (heces) Íleon	6.3
Untypable	Gestación (heces)	3.1
Javiana	Gestación (heces)	3.1
Tokoin	Gestación (heces)	3.1
Newport	Destete (heces)	6.3
Typhimurium	Íleon	3.1
Weltevreden	Agua de charca enfriamiento (Gestación)	3.1
Serrakunda	Gestación (heces) Tejido (ombbligo de lechón)	6.3
Muenchen	Destete (heces)	3.1
Grupo C2	Maternidad (heces) Cucaracha (área de maternidad)	6.3
Grupo E1 (E2-E4)	Agua de desecho fosa común	3.1
Grupo E1	Maternidad (cucaracha) Gestación (agua de charca) Íleon Maternidad (pool de heces)	15.6
Grupo C1	Íleon	3.1
Grupo F	Destete (heces)	3.1

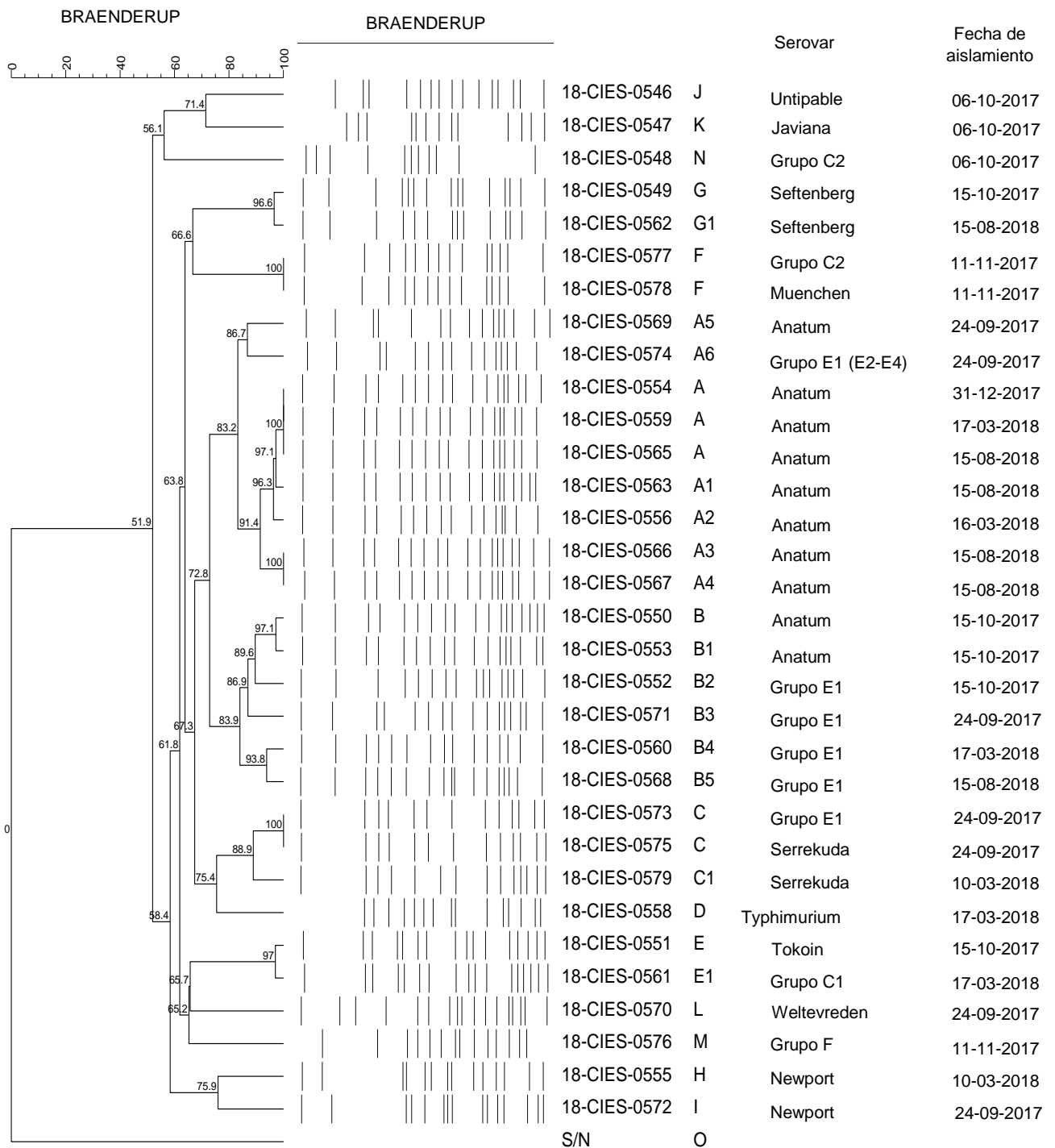


Figura 1. Análisis de PFGE

Los serovares *S. Anatum*, *S. Seftenberg*, *S. Tokoin*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Serrakunda*, *S. Muenchen*, *S. Grupo E1 (E2-E4)*, *S. Grupo E1* y *S. Grupo C1*, presentaron un coeficiente de Jaccard mayor a 0.75 en el análisis de PFGE, por lo que se consideran clonas bacterianas.

Los estudios previos indican la presencia de diversos serovares de *Salmonella* en las heces y tejido intestinal, observándose una alta similitud génica, lo que podría indicar contaminación cruzada, lo que es consistente con los resultados obtenidos en el presente estudio. Además de la similitud génica observada en *S. Anatum* se encontró una alta persistencia, ya que se aisló de muestras tomadas en fechas de hasta 10 meses de diferencia; este hallazgo sugiere la persistencia de *Salmonella* en las distintas áreas. Un informe similar, con 150 días de diferencia entre muestreos, fue observado en el aislamiento del serovar *S. 4, [5], 12: i, S. Rissen* y *S. Derby*, en heces de lechones en una misma granja (Bernad-Roche *et al.*, 2021). Al respecto, Casanova *et al.* (2019) indicaron una similitud de PFGE mayor a 90% para los serovares de *S. Rissen, S. Brandenburg, S. Derby* y observaron patrones de infección a largo plazo (más de 200 días) en lechones. También, informaron una similitud génica en los serovares *S. Derby, S. Anatum* y *S. 4, [5], 12: i*, en cerdas de diferentes granjas a partir de muestras de heces colectadas con más de 300 días de diferencia. Los estudios previos son consistentes con los resultados observados en este estudio, indicando que *Salmonella* puede tener una alta persistencia en las unidades de producción porcina.

2.6 CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que los serovares *S. Anatum, S. Seftenberg, S. Tokoin, S. Newport, S. Typhimurium, S. Serrakunda, S. Muenchen, S. Grupo E1 (E2-E4), S. Grupo E1* y *S. Grupo C1* son clonas bacterianas, lo que sugiere una posible fuente de contaminación cruzada, así como una alta persistencia de *Salmonella* en las unidades de producción porcina analizadas.

2.7 LITERATURA CITADA

HERIKSTAD H, Motarjemi Y, Tauxe RV. 2002. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129(1):1-8. ISSN: 0950-2688. <https://doi.org/10.1017/s0950268802006842>

BERNAD-ROCHE M, Casanova-Higes A, Marín-Alcalá CM, Cebollada-Solanas A, and Mainar-Jaime RC. 2021. *Salmonella* Infection in Nursery Piglets and Its Role in the

Spread of Salmonellosis to Further Production Periods. *Pathogens*. 10(2):1-14. ISSN: 2076-0817. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020123>

CARDOZO-BERNAL AM, Ramón LF, Poutou-Piñales RA, Carrascal-Camacho AK, Zambrano DC. 2012. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ Sci*. 18(2):203-222. ISSN: 0122-7483. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp>

CASANOVA-HIGES A, Marín-Alcalá CM, Andrés-Barranco S, Cebollada-Solanas A, Alvarez J and Mainar-Jaime RC. 2019. Weaned piglets: another factor to be considered for the control of *Salmonella* infection in breeding pig farms. *Veterinary Research*. 50(45): 1-11; ISSN: 1297-9716. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0666-7>

DE BUSSER EV, Maes D, Houf K, Dewulf J, Imberechts H, Bertrand S, De Zutter L. 2011. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol*. 145(1):279–286. ISSN: 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.009>

DOS SANTOS A, Ferrari RG, Conte-Junior CA. 2019. Virulence Factors in *Salmonella Typhimurium*: The Sagacity of a Bacterium. *Current microbiology*. 76(6):762–773. ISSN: 0343-8651. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>

DOS SANTOS BL, Quintana CV, Viana C, Konrad BRC, Camargo CA, Paes de Almeida NPJ, Nero LA, Destro MT. 2019. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Diversity of *Salmonella* along the Pig Production Chain in Southern Brazil. *J pathogens (Basel, Switzerland)*. 8(4):1-10. ISSN: 2076-0817. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040204>

GOMES-NEVES E, Antunes P, Tavares A, Themudo P, Cardoso MF, Gärtner F, Costa JM, Peixe L. 2012. *Salmonella* cross-contamination in swine abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meat handlers. *Int. J. Food Microbiol*. 157(1):82–87. ISSN: 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.015>

HUNG-CHIH K, Tsai-Ling L, Dan-Yuan L, Chiou-Lin C, Pei-Chen C, Shiu-Yun L, Jung-Che K, Ying-Shu L, Chun-Hsing L, Chi-Sen T, Chien-Shun C. 2014. An Association of Genotypes and Antimicrobial Resistance Patterns among *Salmonella* Isolates from Pigs and Humans in Taiwan. *Plos One*. 9(4): e95772. ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095772>

KICH JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, Call JE, Fedorka-Cray P, Luchansky JB. 2011. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 151(3):307- 313. ISSN: 0168-1605 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.024>

KURELJUSIC JM, Dmitrić MP, Vidanović DS, Teodorović VB, Kureljušić, BI, Velhner MJ, Karabasil NR. 2017. Prevalence of *Salmonella enterica* in slaughtered pigs in Serbia: Serotyping, PFGE-genotyping and antimicrobial resistance. *Journal of infection in developing countries.* 11(8): 640-645. ISSN: 1972-2680. <https://doi.org/10.3855/jidc.9311>

MAGISTRALI C, Dionisi AM, De Curtis P, Cucco L, Vischi O, Scuota S, Zicavo A, Pezzotti G. 2008. Contamination of *Salmonella* spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Res. Vet. Sci.* 85(2):204-207. ISSN: 0034-5288. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.12.002>

PIRES SM, Vieira AR, Hald T, Cole D. 2014. Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. *Foodborne Pathog.* 11(9):667-676. ISSN: 1535-3141. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1744>

PIRES SM, de Knecht L, Hald T. 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. *EFSA Supporting.* 8(8):184E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-184>

SANTANA AM, da Silva DG, Maluta RP, Pizauro L, Simplício K, Santana CH, Rodrigues S, Rodrigues D, Fagliari JJ. 2020. Comparative Analysis Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis Highlights a Potential Transmission of *Salmonella* Between Asymptomatic Buffaloes and Pigs in a Single Farm. *Frontiers in veterinary science.* 7:2-7. ISSN: 2297-1769. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.552413>

SIMONS RRL, Hill AA, Swart A, Kelly L, Snary EL A. 2015. Transport and lairage model for *Salmonella* transmission between pigs applicable to EU member States. *Risk Anal.* 36(3):482-497. ISSN:1539-6924. <https://doi.org/10.1111/risa.12390>

SWAMINATHAN B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 7(3):382-389. ISSN: 1080-6059. <https://doi.org/10.3201/eid0703.010303>

VILLALPANDO-GUZMÁN S, Vázquez-Quiñones CR, Natividad-Bonifacio I, Curiel-Quesada E, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. 2017. Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella enterica* aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Rev Chilena Infectol.* 34(5):458-466. ISSN: 0716-1018. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500458>

CAPÍTULO 3. Prevalencia, serovares, y perfiles resistencia a antibióticos en cepas *Salmonella* aisladas de una granja de cerdos de ciclo completo en Sinaloa, México

Alberto Garfio Romero¹, Martín López Valenzuela¹, Javier Alonso Romo Rubio¹, Héctor Samuel López Moreno², Aida de Lourdes Simental Ocegüera³, Saúl Beltrán Fernández⁴, Héctor Raúl Güemes Gaxiola⁵, Gabriela Silva Hidalgo¹.

¹Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, Boulevard San Ángel S/N, Fracc. San Benito, 80246 Culiacán, Sinaloa, México, ²Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria 80040, Culiacán, Sinaloa, México, ³Inoquotech SA de CV Federalismo 44911-5 Residencial Palmillas 80150 Culiacán, Sinaloa INO 181005BZ3, ⁴Centro de Investigación Epidemiológica de Sinaloa Del Hospital General de Culiacán "Bernardo J Gastélum". Juan Aldama S/N esq. Estado de Nayarit, Colonia Rosales, Culiacán, Sinaloa, C.P 80230, ⁵Granja porcina "La Huerta", Sindicatura de Culiacancito, Municipio de Culiacán Rosales, Sinaloa, GPS: Longitud (dec): -107.527222, Latitud (dec): 24.821389. Corresponding author: Gabriela Silva-Hidalgo, Boulevard San Ángel S/N, Fracc. San Benito, 80246 Culiacán, Sinaloa. México. Fax: 6671181650; E-mail: gabsilhid@uas.edu.mx

3.1 RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia, serovares y perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* aisladas de heces y tejidos de cerdos provenientes de una granja comercial de ciclo completo. Se analizaron 227 muestras de heces y tejidos de cerdo; en 21 de las muestras analizadas se aisló *Salmonella*, determinándose una prevalencia del 9.25%. Se identificaron diez serovares diferentes (Anatum, Group E1, Seftenberg, Untypable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Group C2 y Group C1); los serovares observados con mayor frecuencia fueron Anatum (42.85%), Group E1 (14,2%) y Seftenberg (9.52%); el resto tuvo una frecuencia del 4.76%, respectivamente. El 76.1% de los serovares identificados presentó multiresistencia a ampicilina, carbencilina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, netilmicina y gentamicina. Los resultados indican que la multiresistencia a antibióticos

está presente en cepas de *Salmonella* aisladas de heces y tejidos de cerdos en una granja porcina de ciclo completo ubicada en el centro de Sinaloa, México.

Palabras clave: Cerdos, Prevalencia, Resistencia antimicrobiana, *Salmonella*, Serovares

3.2 ABSTRACT

The objective of the study was to determine the prevalence, serovars, and antibiotic resistance profiles in *Salmonella* strains isolated from feces and tissues of pigs from a full-cycle commercial farm. 227 samples of pig feces and tissues were analyzed; *Salmonella* was isolated in 21 of the samples analyzed, determining a prevalence of 9.25%. Ten different serovars were identified (Anatum, Group E1, Seftenberg, Untypable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Group C2 and Group C1); the most frequently observed serovars were Anatum (42.85%), Group E1 (14.2%) and Seftenberg (9.52%); the rest had a frequency of 4.76%, respectively. 76.1% of the identified serovars presented multiresistance to ampicillin, carbencillin, chloramphenicol, sulfamethoxazol-trimethoprim, netilmicin and gentamicin. The results indicate that multiresistance to antibiotics is present in *Salmonella* strains isolated from pig feces and tissues in a full-cycle pig farm located in central Sinaloa, Mexico.

Keywords: Pigs, Prevalence, Antimicrobial resistance, *Salmonella*, Serovars

3.3 INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es un problema de salud pública mundial y una de las causas más importantes de gastroenteritis humana causada por el consumo de productos de origen porcino, bovino y aviar (Zaidi *et al.*, 2006; Arcos-Ávila *et al.*, 2013; Awoke *et al.*, 2018;). Las infecciones por *Salmonella* en cerdos resultan en grandes pérdidas económicas al afectar los índices de productividad como la mortalidad, la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia; también es una de las enfermedades zoonóticas más importantes del mundo (Zaidi *et al.*, 2006). La prevalencia global promedio de granjas porcinas positivas para *Salmonella* es del 59%, con un promedio del 17% de cerdos infectados por granja (Sánchez *et al.*, 2007; Awoke *et al.*, 2018). Durante 2003–2005, Zaidi *et al.* (2006) informaron la prevalencia de 12% de *S. Typhimurium* y *Enteritidis* en

muestras de pacientes con diarrea, muestras de carne pollo, cerdo y bovino; el serovar Typhimurium se encontró en los tres tipos de animales estudiados; el mayor número de aislamientos encontrado fue en la carne de cerdo, seguida de la carne bovina y la carne de pollo (Zaidi *et al.*, 2006). Arcos-Ávila *et al.* (2013), observaron una prevalencia de 4.3% de *Salmonella* en carne de cerdo y en el ambiente de seis rastros y 14 supermercados en el departamento de Tolima, Colombia (superficies de contacto, cuchillos, pisos, etc.). Varios investigadores han aislado *Salmonella* de muestras obtenidas de cerdos en diferentes etapas de producción, a nivel de granja; además, de su aislamiento en canales de cerdo, linfonodos mesentéricos, tonsilas; así como, en utensilios utilizados durante el procesamiento de carne de cerdo como cuchillos y ganchos propios de instalaciones de rastro (Sánchez *et al.*, 2007; Talavera *et al.*, 2011; Salvatierra *et al.*, 2015). Li *et al.* (2014), en un estudio realizado en China, encontró *Salmonella* en la carne de cerdo cruda, que es una de las principales fuentes de enfermedades transmitidas por los alimentos; los valores de prevalencia más altos se encontraron en la carne de cerdo vendida al por menor en los supermercados. Los serovares más frecuentes aislados fueron: Derby, Typhimurium, Meleagridis, Anatum y London. Más del 80% de estos serovares fueron resistentes al menos a un antimicrobiano; la resistencia a tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima y ácido nalidíxico fueron las más frecuentes (Li *et al.*, 2014). Verbrugghe *et al.* (2015), en un estudio que duró cerca de 20 años, observaron una correlación positiva de *Salmonella* enterica serovar 4, [5], 12: i; *Salmonella* enterica serovar Anatum y *Salmonella* enterica serovar Johannesburg entre cerdos y seres humanos. Investigadores del Instituto de Investigación Veterinaria de Onderstepoort en Sudáfrica realizaron un estudio de vigilancia epidemiológica retrospectiva de los serovares de *Salmonella* aislados de varias especies animales entre 2007 y 2014; se registraron un total de 1,229 aislamientos de *Salmonella*, observándose alrededor de 110 serovares diferentes, de nueve especies de animales comestibles y no comestibles (Shivaramu *et al.*, 2013); los serovares más comunes fueron Heidelberg, Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Infantis, Schwarzengrund y Muenchen. Del número total de aislamientos registrados durante el período de revisión, el 0.6 % procedían de muestras tomadas a los cerdos de todas las etapas de producción y durante el procesamiento en el rastro.

En dos sistemas de producción, la prevalencia media fue significativamente mayor en los linfonodos mesentéricos extraídos de canales de cerdo de sistemas de producción convencionales que en los de canales de cerdo de sistemas de producción libres de antimicrobianos. Se encontraron un total de 24 serovares diferentes; Typhimurium, Anatum, Infantis y Derby fueron los más prevalentes (Shivaramu *et al.*, 2013); todos los serovares aislados tenían alta resistencia a tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima y estreptomina. Desde el año 2000, la carne de cerdo ha sido reconocida como un vehículo alimentario común para la exposición a enfermedades en humanos (Mannion *et al.*, 2012). El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia, serovares y perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* aisladas de heces y tejidos de cerdos provenientes de una granja comercial de ciclo completo, ubicada en el centro del Estado de Sinaloa, en el noroeste de México.

3.3 MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

El estudio se realizó en una granja porcina de ciclo completo con una población de cinco mil cerdos en el poblado de Culiacancito, municipio de Culiacán, Sinaloa, México. Se recolectaron 227 muestras de heces de todos los espacios y etapas dentro de la granja (gestación, maternidad, destete y crecimiento/finalización). También se recogieron muestras de agua, alimento, fauna nociva (Cucaracha), intestino delgado (íleon) y linfonodos mesentéricos de cerdos que fueron enviados al rastro.

Colección de muestra

Se recolectaron aproximadamente 40 g de materia fecal en recipientes estériles previamente etiquetados. Se tomaron muestras de ocho cerdas seleccionadas en el área de maternidad 5 días antes del parto y el día después del parto. Las muestras de material fecal que se recogieron de camadas de lechones fueron mezcladas (dos muestras por camada). También se recolectaron muestras de estas mismas camadas 1 día después del cambio de área (por ejemplo, 1 día después de pasar de maternidad a destete y 1 día después de pasar de destete a engorda). También se recogieron muestras de heces durante el transporte al rastro y antes del sacrificio. Durante el

proceso de matanza, se recolectaron aproximadamente 100 gramos de intestino delgado (íleon) y 100 gramos de tejido de nódulo linfático mesentérico. Se recogieron un total de 227 muestras.

Aislamiento de *Salmonella*

Para el aislamiento de *Salmonella*, se pesó 1 g de materia fecal de cada muestra y se incubó para pre-enriquecimiento durante 48 h a 37°C en caldo de tetrionato. Posteriormente, las muestras se inocularon en caldo Rappaport Vassiliadis para un enriquecimiento selectivo y se incubaron durante 24 h a 42°C. Finalmente, las muestras se inocularon en agar Xilosa Lisina Tergitol-4 seguido de un período de incubación de 24 h a 37°C (Mannion *et al.*, 2012). Las colonias con características de *Salmonella* se conservaron en Base Agar Sangre para la posterior extracción de ADN y determinación de perfiles de resistencia antimicrobiana.

Amplificación del gen *invA*

Para confirmar el género bacteriano, se amplificó un fragmento del gen *invA*, que está presente en todos los serovares de *Salmonella*; este gen codifica la invasión del epitelio intestinal (Pastrana *et al.*, 2014). El ADN se extrajo utilizando Instagene Matrix™. Los cebadores *invA*-1 5'GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' e *invA*-2 3'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-5' se utilizaron para amplificar una región de 284 pares de bases (Galán *et al.*, 1992). Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización (94°C por un minuto), alineamiento (64°C por 30 segundos), extensión (72°C por 30 minutos), y una extensión final (72°C por siete minutos), por 35 ciclos.

Serotipado

El serotipado de cepas de *Salmonella* se realizó en el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de Sinaloa (Culiacán, Sinaloa, México), el cual está certificado por la Organización Mundial de la Salud y la Red Global de Infecciones Transmitidas por Alimentos. La serotipificación se realizó de acuerdo con el esquema internacional de

serotipificación de Kauffman-White, utilizando antisueros de diagnóstico polivalentes, monovalentes y factores O y H (Kauffman, 1972).

Determinación de perfiles de resistencia antimicrobiana

La determinación de los perfiles de resistencia a los antimicrobianos se realizó por triplicado utilizando el método de difusión en disco, descrito por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico, para amikacina (AK), ampicilina (AM), carbencilina (CB), cefalotina (CF), cefataxina (CFX), ciprofloxacina (CPF), cloranfenicol (CL), gentamicina (GE), netilmicina (NET), nitrofurantoína (NF), norfloxacina (NOF) y sulfametoxazol-trimetropim (SXT). Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 h. Se usó *S. typhimurium* ATCC 14028S como control de calidad. Los aislados resistentes a tres o más antibióticos pertenecientes a diferentes grupos se registraron como aislados multirresistentes.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aisló *Salmonella* multirresistente (género confirmado mediante PCR) en 21 de las 227 muestras analizadas, observándose una prevalencia del 9.25% (IC95% 5.26-13.24). (Cuadro 1; Figura 1). Se identificaron diez serovares diferentes (Cuadro 2). Los resultados de la resistencia antimicrobiana se presentan en la Cuadro 3.

Las infecciones por *Salmonella* en cerdos resultan en grandes pérdidas económicas al afectar negativamente los índices de productividad como la mortalidad, la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia, también es una de las enfermedades zoonóticas más importantes en el mundo. Según Sánchez *et al.* (2007), el promedio mundial de granjas porcinas positivas para *Salmonella* es de alrededor del 59 %, con un promedio del 17 % de cerdos infectados por granja.

En esta investigación se aisló *Salmonella* de heces recolectadas en diferentes etapas de producción y de tejido de íleon que en este estudio el resultado fue de 9.25% de prevalencia que está por debajo del 56% de prevalencia encontrado por Arcos-Ávila *et al.* (2013) en hisopos de canales. Calvete *et al.* (2015) realizaron una investigación en Buenos Aires en la que se analizaron 200 muestras correspondientes a diferentes etapas de producción, obtuvieron una prevalencia del 3.37%, que tampoco es similar a las obtenidas en nuestro estudio. Calvete *et al.* (2015) informaron de un fragmento

del gen *invA* en el 100% de las muestras de aislados bacterianos que amplificaron mediante PCR, este factor de virulencia codifica en la isla de patogenicidad 1 (IPS1) y está asociado con la capacidad de la bacteria para ingresar a las células epiteliales, los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con ese hallazgo.

Ibar (2017), encontró una prevalencia de *Salmonella* del 44% en muestras de linfonodos mesentéricos; se identificaron 15 serovares diferentes, siendo los serovares más prevalentes: Schwarzengrund, Heidelberg, subsp I (6,8:e,h:-), Derby, Bredeney y Typhimurium, esos resultados difieren a lo observado en este estudio en el que se identificaron 10 serovares diferentes de 21 aislamientos (Untypable, Javiana, Seftenberg, Anatum, Tokoin, Newport, Typhimurium, Group E1, Group C1 y Group C2), siendo el serovar Anatum el más prevalente (42.85%). Además de encontrarlo durante el sacrificio, el serovar Anatum fue el más prevalente, estuvo presente en todas las áreas de la granja, excepto en el área de destete. Newport fue el serovar más prevalente en el área de destete. La diversidad de serovares encontrados durante el ciclo de producción y en el rastro apoya la hipótesis de que la contaminación del medio ambiente se produce a través de la excreción de bacterias a través de las heces.

Ibar (2017) examinó los perfiles de resistencia a los antimicrobianos, encontró resistencia a la ampicilina en el 22% de las muestras, en tanto que Talavera *et al.* (2011) observaron una resistencia del 17.4%. En este estudio se observó una resistencia a la ampicilina en el 100% de los serovares. Talavera *et al.* (2011) observaron que el 25.28% de los aislados fueron resistentes al cloranfenicol; en el presente estudio el 66.6% de los serovares mostró resistencia al cloranfenicol. Los perfiles de resistencia antimicrobiana de los serovares identificados en este estudio difieren de los encontrados por otros investigadores. Los altos valores de prevalencia, la diversidad de serovares encontrados y la multirresistencia encontrada en este estudio deberían alertar a los médicos involucrados en el proceso de producción sobre el uso de terapias antimicrobianas. Estos hallazgos también indicaron que *Salmonella* presenta un riesgo como enfermedad zoonótica en el rastro.

Cuadro 1. Prevalencia de *Salmonella* en las muestras analizadas

Área de muestreo	Muestras analizadas	Muestras positivas	Prevalencia %
Gestación (heces) ^a	17	2	11.76
Maternidad (heces) ^b	27	3	11.11
Maternidad (heces de lechones) ^c	11	1	9.09
Destete (heces) ^d	22	2	9.09
Engorda (heces) ^e	17	1	5.88
Embarque (heces) ^f	16	0	0
Desembarque (heces) ^g	7	0	0
Íleon	48	10	20.83
linfonodos mesentéricos	45	0	0
Fauna nociva (cucaracha)	4	1	25
Heces de roedores	5	1	20
Agua de estanque de enfriamiento ⁱ	8	0	0
	227	21	9.25%

^aHeces recogidas en pasillo de cerdas en zona de gestación. ^bHeces recogidas de jaulas de cerdas en el área de maternidad un día después del parto. ^cHeces recogidas de lechones un día después del parto. ^dHeces recogidas de cerdos un día después de su estancia en la zona de destete. ^eHeces recolectadas de cerdos un día después de su llegada a la zona de engorda. ^fHeces recolectadas de los cerdos durante el traslado al rastro. ^gHeces recolectadas de cerdos 24 horas después del transporte en un corral de recepción desde un rastro tipo inspección federal (TIF). ^hLinfonodos mesentéricos obtenidos durante el proceso de sacrificio en el rastro TIF. ⁱTejido de ileon obtenido durante el proceso de sacrificio en el rastro TIF. ⁱMuestra de agua utilizada para enfriar cerdos en la zona de engorda.

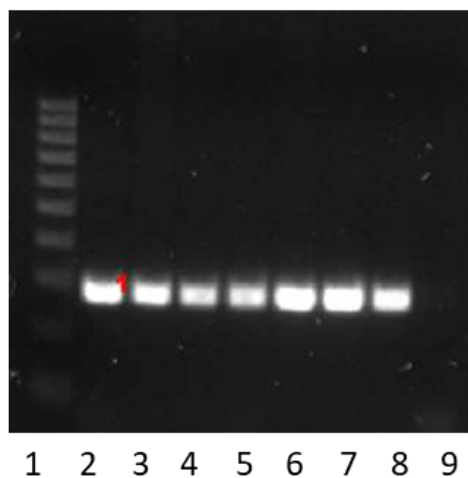


Figura 1. Amplificación del gen *invA*. Carril 1, marcador de par de bases; carril 2, control positivo; carril 3, heces del área de gestación; carril 4, heces del área de maternidad; carril 5, heces del área de destete; carril 6, heces del área de engorde; carril 7, muestra de tejido (íleon); carril 8, heces de roedores; carril 9, control negativo (agua destilada).

Cuadro 2. Serovares de *Salmonella* aislados de heces de cerdo, cucarachas, dentro de la granja y de tejidos obtenidos durante la matanza en un Rastro Tipo Inspección Federal.

Serovar	Porcentaje de aislamiento	Fuente de aislamiento
		Maternidad (heces de lechones)
		Heces de roedor
Anatum	42.85%	
		Engorda (heces)
		Ileon
Seftenberg	9.52%	Maternidad (heces)
		Ileon
Untypable	4.76%	Gestación (heces)
Javiana	4.76%	Gestación (heces)
Tokoin	4.76%	Gestación (heces)
Newport	4.76%	Destete (heces)
Typhimurium	4.76%	Ileon
Group C2	4.76%	Maternidad (heces)
		Cucaracha (area de maternidad)
Group E1	14.2%	Ileon
		Ileon
Group C1	4.76%	Ileon

Cuadro 3. Resistencia antimicrobiana de los serovares de *Salmonella*.

Serovar de <i>Salmonella</i>	Total	AK	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NF	NOF	SXT
Untypable	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Javiana	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Group C2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Seftenberg	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anatum	9	0	9	9	0	0	0	9	0	0	0	0	9
Tokoin	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Group E1	3	0	3	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Newport	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Typhimurium	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Group C1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	21	0	21	21	0	0	0	14	0	1	0	0	11
Resistencia, %		0	100	100	0	0	0	66.6	0	4.7	0	0	52

Amikacina (AK), ampicilina (AM), carbencilina (CB), (CPF), cloranfenicol (CL), gentamicina (GE), netilmicina (NET), nitrofurantoína (NF), norfloxacin (NOF), sulfametoxazol-trimetropim (SXT)

3.5 CONCLUSIONES

La prevalencia de *Salmonella* en los cerdos en la unidad de producción porcina estudiada fue del 9.25%; los serovares con mayor frecuencia en los aislamientos realizados fueron Anatum (42.85%), seguido de Group E1 (14.2%), y Seftenberg (9.52%); los serovares Untypable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Group C2 y Group C1 tuvieron una prevalencia del 4.76%, respectivamente. Todos los serovares observados mostraron resistencia a ampicilina y carbencilina; fueron sensibles a cefalotina, cefataxina, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína y norfloxacin. Aunque la prevalencia observada de *Salmonella* es baja, la resistencia a antimicrobianos y la presencia de *Salmonella* en los cerdos a nivel de granja y en rastro, representa un riesgo potencial para la salud pública.

3.6 LITERATURA CITADA

1. Arcos-Ávila EC, Mora-Cardona L, Fandiño-de Rubio LC, Rondón-Barragán IS. 2013. Salmonella spp. prevalence in pork, slaughterhouses and butcher's shops in the Tolima department of Colombia. *Rev. Orinoquia*, **17**: 59-68. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v17n1/v17n1a07.pdf>
2. Awoke KG, Palesa N, Itumeleng M. 2018. Detection of *Salmonella* from animal sources in South Africa between 2007 and 2014. *J. S Afr Vet Assoc.*, **89**: 1643. <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1643>
3. Calvete C, Colello R, Analía IE. 2015. Detection and characterization of *Salmonella* spp. in the pig production chain. Bachelor Thesis in Food Technology with Mention in Products of Animal Origin. Argentina. <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/538/CALVETE%2>
4. Galán J, Ginocchio C, Costeas P. 1992. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.*, **13**: 4338-4349. <https://doi.org/10.1128/jb.174.13.4338-4349.1992>
5. Ibar MP. 2017. Salmonella in pigs: serovars and aspects of antimicrobial resistance related to public health in strains isolated on farms and in slaughtered animals. Doctoral thesis. Silver National University. Argentina
6. Kauffmann F. 1972. Serological diagnosis of Salmonella-species, Kauffmann-White-schema. Baltimore: Williams and Wilkins
7. Mannion C, Fanning J, McLernon J, Lendrum L, Gutierrez M, Duggan S, Egan J. 2012. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. *Rev. Food Res Int.*, **45**: 871-879. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.001>
8. Pastrana APC, Mogollón JDG, Rincón MA. 2014. Salmonellosis pig and its importance in the production chain. *Rev. IVIS.*, **81**:16-21

9. Salvatierra GR, Pinto C, Inga E, Siuce J. 2015. Detection of *Salmonella* sp in pork carcasses in slaughterhouses in lima, peru. *Rev. Inv Vet.*, 26: 682-688. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11206>
10. Sánchez J, Dohoo IR, Christensen J, Rajic A. 2007. Factors influencing the prevalence of *Salmonella* spp. in swine farms: a meta-analysis approach, *Rev. Vet Med.*, **81**:148–177. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.04.005>
11. Shivaramu K, Morgan HS, William MM, Wondwossen AG, Maria C, Rajesh N, Rossina S, Siddhartha T. 2013. Longitudinal Study of Distributions of Similar Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars in Pigs and Their Environment in Two Distinct Swine Production Systems. *J. Appl Environ Microbiol.*, **79**: 5167–5178. <https://doi.org/10.1128/AEM.01419-13>
12. Verbrugge E, Parys AV, Leyman B, Boyen F, Haesebrouck F, Pasmans F. 2015. HtpG contributes to *Salmonella* Typhimurium intestinal persistence in pigs. *Vet Res.*, **46**:118. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0261-5>
13. Talavera RM, Vázquez CJC, Flores BR, Robles GF, Lagunas BS, Alonso FMU. 2011. GyrA gene mutations and fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolates from pigs in central Mexico. *J. Vet Rec.*, **160**: 630-632. <https://doi.org/10.1136/vr.160.18.630>
14. Zaidi MB, Macías CL, Calva E. 2006. Mexican studies on Salmonella: epidemiology, vaccines and molecular biology. *Rev. Lat Microbiol.*, **48**: 121-125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17578083/>
15. Zaidi MB, McDermott PF, Fedorka-Cray V, León C. Canché, Hubert SK, León AM, Zhao SM, Tollefson LH. 2006. Non-typhoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Rev. Clin Infect Dis.*, **42**:21-28. <https://doi.org/10.1086/498508>

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados del presente estudio indican que los serovares Anatum, Seftenberg, Tokoin, Newport, Typhimurium, Serrakunda, Muenchen, Grupo E1 (E2-E4), Grupo E1 y Grupo C1 son clonas bacterianas, lo que sugiere una posible fuente de contaminación cruzada de *Salmonella* en las unidades de producción porcina analizadas.

La prevalencia observada de *Salmonella* fue del 9.34%; los serovares identificados con mayor frecuencia en los aislamientos realizados fueron *Anatum*, seguido de Group E1, y Seftenberg; los serovares Untypable, Javiana, Tokoin, Newport, Typhimurium, Group C2 y Group C1 tuvieron la más baja frecuencia. Todos los serovares observados mostraron resistencia a ampicilina y carbencilina; fueron sensibles a cefalotina, cefataxina, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína y norfloxacina. Aunque la prevalencia observada de *Salmonella* es baja (9.34%), la resistencia a antimicrobianos y la presencia de *Salmonella* en los cerdos a nivel de granja y en rastro, representa un riesgo potencial para la salud pública.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

Alfaro R. 2018. Aspectos relevantes sobre *Salmonella* spp. en humanos. Revista Cubana de Medicina General Integral, 110–122. <http://scielo.sld.cu>

Alvarado D. 2017. Tipificación molecular de aislados de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* de muestras obtenidas de sistemas de producción avícola en Perú [Universidad Ricardo Palma]. http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1702/Alvarado_Daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Aleman M. 2019. Caracterización genómica de la capacidad virulenta de una cepa de *Salmonella* Typhimurium aislada de *Cavia porcellus* (cuy) [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/10123/Aleman_am.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Andreu M M, Allué M, Hernández C, Andrés I. 2016. Brote por *Salmonella* serovar *Poona* en una guardería. Revista Pediátrica, 35–43. http://scielo.isciii.es/pdf/pap/v18n69/06_original3.pdf

Angulo FJ, Nargund VN, Chiller TC. 2004. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health, **51**: 374-379. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00789.x>

Arcos-Ávila EC, Mora-Cardona L, Fandiño-de Rubio LC, Rondón-Barragán IS. 2013. *Salmonella* spp. prevalence in pork, slaughterhouses and butcher's shops in the Tolima department of Colombia. Rev. Orinoquia, 17: 59-68. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v17n1/v17n1a07.pdf>

Awoke KG, Palesa N, Itumeleng M. 2018. Detection of *Salmonella* from animal sources in South Africa between 2007 and 2014. J. S Afr Vet Assoc., **89**: 1643. <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1643>

EFSA (European Food Safety Authority), Amore G, Beloeil PA, Garcia Fierro R, Guerra B, Papanikolaou A, Rizzi V and Stoicescu AV. 2023. Manual for reporting 2022 antimicrobial resistance data within the framework of Directive 2003/99/EC and

Decision 2020/1729/EU. EFSA supporting publication 2023: 20(1):EN-7826. 31 pp.
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-7826>

Barreto M, Castillo M, Retamal P. 2016. *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 547–557. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000500010>

Bellido N. 2019. Interacción patógeno-hospedador en la Salmonelosis porcina. Modulación de la respuesta inmune intestinal por *Salmonella* y mecanismos de persistencia [Universidad de Córdoba]. <https://helvia.uco.es/handle/10396/19494>

Bernad-Roche M, Casanova-Higes A, Marín-Alcalá CM, Cebollada-Solanas A, Mainar-Jaime RC. 2021. Salmonella Infection in Nursery Piglets and Its Role in the Spread of Salmonellosis to Further Production Periods. *Pathogens* 10, 123. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020123>

Bisio J. 2017. Evaluación de métodos moleculares como reemplazo para la serotipificación clásica de *Salmonella enterica* [Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19126/1/uy24-18746.pdf>

Bumann D, Schothorst J. 2017. Intracellular *Salmonella* metabolism. *Cellular Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/cmi.12766>

Calvete C, Colello R, Etcheverría A. 2015. Detección y caracterización de *Salmonella* spp. en la cadena productiva porcina [UNCPBA]. <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/538/CALVETE%2>

Cardozo-Bernal AM, Ramón LF, Poutou-Piñales RA, Carrascal-Camacho AK, Zambrano DC. 2013. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ Sci* 18(2): 203-222

Consejo Mexicano de la Carne. Compendio Estadístico 2017. <http://comecarne.org/wp-content/uploads/2018/05/Compendio-Estad%C3%ADstico-2017-v7-1-sin-elab.pdf>

Correa V. 2018. Validación del Método de Ensayo Rápido (MERs) para la Detección e Identificación de la especie *Salmonella enterica* en la matriz Harina de Pescado [Universidad Ricardo Palma]. http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1416/Correa_vr.pdf?sequence=1

- CIMA. 2018. Centro de Información de Mercados Agroalimentarios & ASERCA. Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. Reporte del Mercado de Carne de Porcino. https://www.cima.aserca.gob.mx/work/models/cima/pdf/cadena/2018/Reporte_mercao_porcino_290618.pdf .
- CMC. 2017. Consejo Mexicano de la Carne. Compendio Estadístico 2017. <https://www.comecarne.org>
- Chattaway MA, Langridge GC, Wain J. 2021. Salmonella nomenclature in the genomic era: a time for change. *Sci Rep* 11, 7494.
- Chávez V. 2020. La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *Revista Especializada En Ciencias Químico- Biológicas*, 1–11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Cruz C. 2017. Sensibilidad antimicrobiana en cepas de Salmonella spp. de importancia en salud pública [Universidad Ricardo Palma]. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Damián S. 2019. Identificación de factores de riesgo y caracterización de la resistencia a los antimicrobianos en Salmonella spp. en granjas y carcasas de pollos en el área de influencia del cantón Quito (Vol. 4) [Universidad Central del Ecuador]. <http://200.12.169.19:8080/bitstream/25000/20273/1/T-UCE-0014-MVE-004-P.pdf>
- De Busser EV, Maes D, Houf K, Dewulf J, Imberechts H, Bertrand S, De Zutter L. 2011. Detection and characterization of Salmonella in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 279–286.
- Díaz G. 2016. Evaluación de una técnica de PCR múltiple para la detección rápida de Salmonella Typhimurium y / o Enteritidis en cobayos naturalmente infectados. [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/5216/Diaz_og.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Dos Santos BL, Quintana CV, Viana C, Konrad BRC, Camargo CA, Paes de Almeida NPJ, Nero LA, Destro MT. 2019. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Diversity of Salmonella along the Pig Production Chain in Southern Brazil. *J pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(4), 204. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040204>

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 167-193.

<https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

Dufresne K, Saulnier-Bellemare J, Daigle F. 2018. Functional analysis of the chaperone-usher fimbrial gene clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00026>

Duguid JP, Gillies RR. 1958. Fimbriae and haemagglutinating activity in *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* and *Chromobacterium*. *Journal of Pathology and Bacteriology* 75, 519–520. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-1-1>

Esteve P. 2017. Detección de la presencia e *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en alimentos por técnicas de cultivo y técnicas moleculares [Universitat Politècnica de València].

https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/85541/memoria_20855937.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ferrari R, Rosario D, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo E, Conte-Juniora C. 2019. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: A meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1–21.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>

Fois F, Piras F, Torpdahl M, Mazza R, Consolati SG, Spanu C, Scarano C, De Santis EP. 2017. Occurrence, Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella enterica* in Slaughtered Pigs in Sardinia. *J Food Sci. Apr*;82(4):969-976.

<https://doi.org/10.1011/1750-3841.13657>

Frutos L, López B. 2018. Brote de *Salmonella* Typhimurium monofásica asociada al consumo de carne asada de cerdo, *Rev Esp Quimioter* .2018;31 (2): 156- 159

Gast R, Porter R. 2020. *Salmonella* infections. *Diseases of Poultry*, 717–753.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119371199.ch16>

Gaspar J. 2018. Caracterización genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas desde plantales porcinos [Universidad de Chile]. <https://doi.org/10.5354/0717-8883.1986.23789>

Gomes-Neves E, Antunes P, Tavares A, Themudo P, Cardoso MF, Gärtner F, Costa JM, Peixe L. 2012. *Salmonella* cross-contamination in swine abattoirs in Portugal:

Carcasses, meat and meat handlers. *Int. J. Food Microbiol.* 157: 82–87.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.015>

Gonzalez J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. 2014. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte. Barranquilla.* 30 (1): 73-94.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81730850009>

Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA, Weill FX. 2010. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161: 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.10.002>

Grimont PAD, Weill FX. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. Available at:

<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>

Herrera B, Jabib YL. 2015. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. *REDEVET. Revista Electrónica de Veterinaria.* 16(1), 1-19. ISSN:

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63638739002>

Kuo HC, Lauderdale TL, Lo DY, Chen CL, Chen PC, Liang SY, Kuo JC, Liao YS, Liao CH, Tsao CS, Chiou CS. 2014. An Association of Genotypes and Antimicrobial Resistance Patterns among *Salmonella* Isolates from Pigs and Humans in Taiwan. *PLoS ONE* 9(4): e95772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095772>

Ibar MP. 2017. *Salmonella* in pigs: serovars and aspects of antimicrobial resistance related to public health in strains isolated on farms and in slaughtered animals. Doctoral thesis. Silver National University. Argentina.

ISO. 2017. Norma ISO 6579-1:2017, Detección de *Salmonella* spp.: Análisis de cambios por el centro nacional de alimentación. *Journal of Chemical Information and Modeling,* 1689–1699.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Jacob JJ, Solaimalai D, Muthurilandi Sethuvel DP, Rachel T, Jeslin P, Anandan S, Veeraraghavan B. 2020. A nineteen-year report of serotype and antimicrobial susceptibility of enteric non-typhoidal *Salmonella* from humans in Southern India:

changing facades of taxonomy and resistance trend. Gut pathogens, 12:49. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00388-z>

Jajere SM. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Veterinary World, 504–521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

Japón M. 2019. Aislamiento y Serotipificación de *Salmonella* en carcasas de pollo en percha en la ciudad de Quito. [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18588/1/T-UCE-0014-MVE-047.pdf>

Jung Y, Porto-Fett A, Shoyer B, Henry E, Shane L, Osoria M, Luchansky J. 2019. Prevalence, levels, and viability of *Salmonella* in and on raw chicken livers. Journal of Food Protection, 834–843.

Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, Call JE, Fedorka-Cray P, Luchansky JB. 2011. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. Int. J. Food Microbiol. 151: 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.024>

Ksibi B, Ktari S, Othman H, Ghedira K, Maalej S, Mnif B, Abbassi M.S, Fabre L, Rhimi F, Le Hello S, Hammami A. 2021. Comparison of conventional molecular and whole-genome sequencing methods for subtyping *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains from Tunisia. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 40(3), 597–606. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04055-8>

Langridge GC, Wain J, Nair S. 2008. Invasive Salmonellosis in humans. Chapter 8.6.2.2 (revised version). In: Böck A, Curtiss R III, Kaper JB, Neidhardt, FC, Nyström T, Rudd KE. and Squires CL. (eds) EcoSal – *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC

Lan TTQ, Gaucher ML, Nhan NTM, Letellier A, Quessy S. 2018. Distribution of Virulence Genes among *Salmonella* Serotypes Isolated from Pigs in Southern Vietnam. J Food Protection. 81(9):1459-1466. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-408>

- Ledeboer NA, Jones BD. 2005. Exopolysaccharide Sugars Contribute to Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on HEp-2 Cells and Chicken Intestinal Epithelium. *Journal of Bacteriology*, **187**: 3214-3226. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3214-3226.2005>
- Leiva J, Fernández A, Rubio M, Ruiz-bravo A. 2018. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. *Medicine*, 2941–2951. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.011>
- Luigi T, Rojas L, Valbuena O. 2015. Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp. usando el gen *invA*. *Salus*, 19(3) <http://www.scielo.org.ve/pdf/s/v19n3/art08.pdf>
- Marston H, Dixon D, Knisely J, Palmore T, Fauci A. 2016. Antimicrobial resistance. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 1193–1204. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11764>
- Majchrzak M, Krzyzanowska A, Kubiak AB, Wojtasik A, Wolkowicz T, Szych J, Parniewski P. 2014. TRS-based PCR as a potential tool for inter-serovar discrimination of *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Newport* and *S. Anatum*. *Mol Biol Rep* 41:7121–7132. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3592-9>
- Magistrali C, Dionisi AM, De Curtis P, Cucco L, Vischi O, Scuota S, Zicavo A, Pezzotti G. 2008. Contamination of *Salmonella* spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Res. Vet. Sci.* **85**: 204–207. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.12.002>
- Mcquate S, Young A, Silva-Herzog E, Bunker E, Hernandez M, De Chaumont F, Lui X, Detweiler C, Palmer A. 2017. Long-term live-cell imaging reveals new roles for *Salmonella* effector proteins SseG and SteA. *Cellular Microbiology*, 1–17. <https://doi.org/10.1111/cmi.12641>
- McDermott P, Zhao S, Tate H. 2018. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiology Spectrum*, 261–287. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0014-2017>
- Melo D. 2015. Identificación de *Salmonella enterica* de interés zoonótico serovariedades Enteritidis, Typhimurium e Infantis en un pollo bebé de un día de edad en sistema productivo de pollo de engorde en la provincia de Pichincha [Universidad

Central del Ecuador]. In Titulación - Medicina Veterinaria y Zootecnia. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6912>

Meneguzzi M, Pissetti C, Rebelatto R, Trachsel J, Kuchiishi SS, Reis AT, Guedes RMC, Leão JA, Reichen C, Kich JD. 2021. Re-Emergence of Salmonellosis in Hog Farms: Outbreak and Bacteriological Characterization. *Microorganisms* 9:947. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050947>

Mirko KJ, Predrag DM, Svetislav VD, Božidar TV, Ilija KB, Josip VM, Ratko KN. 2017. Prevalence of *Salmonella enterica* in slaughtered pigs in Serbia: Serotyping, PFGE-genotyping and antimicrobial resistance. *J Infect Dev Ctries* 11(8):640-645. <https://doi.org/10.3855/jidc.9311>

Muriel JC. 2019. Determinación de la presencia de *Salmonella* spp. en alimentos de venta ambulante muestreados en el parque “La Carolina” del Distrito Metropolitano de Quito [Universidad Central del Ecuador]. <http://200.12.169.19:8080/bitstream/25000/19249/1/T-UCE-0008-CQU-151.pdf>

Naberhaus SA. 2019. Investigation of pathogenicity, competitive fitness, and novel methods for rapid diagnosis of *Salmonella* 4 , [5], 12 : i : - in swine [Iowa State University]. <https://lib.dr.iastate.edu/etd/17521>

Nascentes Galvão N, Chiarini E, Destro MT, de Aguiar Ferreira M, Nero LA. 2012. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science*, 92: 635-643. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.011>

Oliva DM, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-Based Typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1661-1669.1999>

Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype enteritidis documented by IS200-, ribo-, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40: 15-22. <https://doi.org/10.1099/00222615-40-1-15>

Ortega M. 2019. Prevalencia de *Salmonella* spp. en cerdas reproductoras en España [Universidad Católica de Valencia].

<https://riucv.ucv.es/bitstream/handle/20.500.12466/79/TFGMARCdefinitiu.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Piras F, Fois F, Mazza R, Putzolu M, Delogu ML, Lochi PG, Pani SP, Mazzette R. 2014. Salmonella Prevalence and Microbiological Contamination of Pig Carcasses and Slaughterhouse Environment. Ital J Food Saf. 2014 Dec 10;3(4):4581. <https://doi.org/10.10.4081/ijfs.4581>

Pires SM, de Knecht L, Hald T. 2017. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union. EFSA Supporting 8: 184E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.ES-184>

Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. Journal of bacteriology, 186(17), 5883–5898. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5883-5898.2004>

Pribul B, Festivo M, Rodrigues M, Costa R, Rodrigues E, De Souza M & Rodrigues D. 2017. Characteristics of quinolone resistance in Salmonella spp. isolates from the food chain in Brazil. Frontiers in Microbiology, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00299>

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nature Immunol 2:361-367. <https://doi.org/10.1038/86373>

Ruiz M, Ramallo G, Colello R, Villalobo C, Monteavaro C, Etcheverría A, Padola N. 2018. Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp. en canales porcinos. Revista Colombiana de Biotecnología, 117–123. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.71680>

Sabag A. 2017. Análisis comparativo de los genes involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum* [Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/151424/Analisis-comparativo-de-los-genes-involucrados-en-la-supervivencia-intracelular-de-Salmonella-enterica-serovar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Santana AM, da Silva DG, Maluta RP, Pizauro L, Simplício K, Santana CH, Rodrigues S, Rodrigues D, Fagliari JJ. 2020. Comparative Analysis Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis Highlights a Potential Transmission of *Salmonella* Between Asymptomatic Buffaloes and Pigs in a Single Farm. *Frontiers in veterinary science*, 7, 552413. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.552413>

Santos D. 2016. Perfil de excreção de *Salmonella* em suínos ao abate e presença de carcaças positivas no pré-resfriamento [Universidad Federal do Rio Grande do sul]. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Sanderson KE, Nair S. 2013. Taxonomy and Species Concepts in the Genus *Salmonella*. CAB International. *Salmonella in Domestic Animals*, 2nd Edition (eds P.A. Barrow and U. Methner)

Salas R. 2016. *Salmonella* spp., resistencia a antimicrobianos y caracterización de medidas de bioseguridad en sistemas productivos de traspatio vecinos a La Reserva Nacional “El Yali”. [Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140751/Salmonella-spp-resistencia-a-antimicrobianos-y-caracterizacion-de-medidas-de-bioseguridad-en-sistemas-productivos-de-traspatio-vecinos-a-La-Reserva-Nacional-El-Yali.pdf?sequence=1>

Santajit S, Indrawattana I. 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International*, 1–8. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2475067/>

Serra MÁ. 2017. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 402–419. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011

Silva-Hidalgo G., Ortiz-Navarrete V. F, Alpuche-Aranda C. M., Rendón-Maldonado J. G, López-Valenzuela M, Juárez-Barranco F, & López-Moreno H. S. 2012. Non-typhi *Salmonella* serovars found in Mexican zoo animals. *Research in veterinary science*, 93(3), 1132–1135. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.005>

Silva-Hidalgo G & López-Moero H. S. 2012. Genes involucrados en la patogénesis, persistencia y excreción de *Salmonella* en modelos animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(1), 107-122.

Simental L, Martínez-Urtaza J. 2008. Climate Patterns Governing the Presence and Permanence of *Salmonellae* in Coastal Areas of Bahia de Todos Santos, México. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5918-5924. <https://doi.org/10.1128/AEM.01139-08>

Sinwat N, Angkittitrakul S, Chuanchuen R. 2015. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated from Pork, Chicken Meat, and Humans in Northeastern Thailand. *Foodborne Pathog Dis.* Sep;12(9):759-65. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.1946>

Solarte A. 2017. Uso de aceites esenciales para el control de la infección por *Salmonella* spp. en sanidad animal [Universidad de Córdoba]. <http://hdl.handle.net/10396/15783>

Sbrogio-Almeida ME, Mosca T, Massis LM, Abrahamsohn IA and Ferreira LC. 2004. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity* 72, 2546–2555

Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45: 502-531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>

Simons RRL, Hill AA, Swart A, Kelly L, Snary EL A. 2016. Transport and lairage model for *Salmonella* transmission between pigs applicable to EU member States. *Risk Anal.* 36: 482–497. <https://doi.org/10.1111/risa.12390>

Shivaramu K, Morgan HS, William MM, Wondwossen AG, Maria C, Rajesh N, Rossina S, Siddhartha T. 2013. Longitudinal Study of Distributions of Similar Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars in Pigs and Their Environment in Two Distinct Swine Production Systems. *J. Appl Environ Microbiol*, 79: 5167–5178. <https://doi.org/10.1128/AEM.01419-13>

Schielke A, Rabsch W, Prager R, Simon S, Fruth A, Helling R, Schnabel M, Siffczyk C, Wiczorek S, Schroeder S, Ahrens B, Oppermann H, Pfeiffer S, Merbecks SS, Rosner

B, Frank C, Weiser AA, Lubner P, Gilsdorf A, Stark K. 2017. Two consecutive large outbreaks of *Salmonella* Muenchen linked to pig farming in Germany, 2013 to 2014 : Is something missing in our regulatory framework ? *Eurosurveillance*, 1–10. <https://www.cdc.gov/national-surveillance/pdfs/salmonella-serotypes-isolated-animals-and-related-sources-508.pdf>

Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 7: 382–389. <https://doi.org/10.3201/eid0703.010303>

Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, Lukinmaa S, Kam KM, Rolando S, Pérez G E, Binsztein N. 2006. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis.*, 3: 36–50. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.36>

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>

Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653930>.

Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. 2017. Implicaciones estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International Journal of Morphology*, 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>

Van Duijkeren E, Schink A, Roberts M, Wang Y, Schwarz S. 2017. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Journal Medical Libanais*, 186–198. <https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch4>

Vázquez TA, Jones JC, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401:804-808. <https://doi.org/10.1038/44593>

Vega-Sánchez V, Barba-León J, González-Aguilar DG, Cabrera-Díaz E, Pacheco-Gallardo C, Orozco-García AG. 2020. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aisladas de canales de cerdo obtenidas de dos tipos de rastros en Jalisco, México. *Rev Mex Cienc Pecu.*, 11(4):1004-1015. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5386>.

Velasco J, Araque M, Ayala J, Dávila D, Peña Z, Mendoza R. 2019. Patogenia de mutantes de *Salmonella* Typhimurium en dos modelos experimentales in vivo. *VacciMonitor*, 1–8. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vaccimonitor/vcm-2019/vcm191a.pdf>

Vico JP, Lorenzutti AM, Zogbi AP, Aleu G, Sanchez IC, Caffer MI, Rosmini RC, Mainar-Jaime RC. 2020. Prevalence, associated risk factors, and antimicrobial resistance profiles of non-typhoidal *Salmonella* in large scale swine production in Córdoba, Argentina. *Research in Veterinary Science*. 130:161-169. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.003>

Villalpando-Guzmán S, Vázquez-Quiñones CR, Natividad-Bonifacio I, Curiel-Quesada E, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. 2017. Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella enterica* aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Rev Chilena Infectol* 34 (5): 458-466. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500458>

Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ. 2004. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Di.*, 38:149-56. <http://dx.doi.org/10.1086/381581>

Li YC, Pan ZM, Kang XL, Geng SZ, Liu ZY, Cai YQ, Jiao XA. 2014. Prevalence, characteristics, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* in retail pork in Jiangsu province, eastern China. *J Food Prot.*, 77(2):236-45. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-269>

Zabaleta G. 2015. Evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp., aislada en la cadena cárnica porcina en tres regiones del país. [Pontificia Universidad Javeriana]. In *The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Zaidi MB, McDermott PF, Fedorka-Cray V, León C. Canché, Hubert SK, León AM, Zhao SM, Tollefson LH. 2006. Non-typhoidal Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Rev. Clin Infect Dis.*, 42:21-28. <https://doi.org/10.1086/498508>

Zaidi MB, Campos FD, Estrada-García T, León M, Chim R and Calva J. 2012. Burden and Transmission of Zoonotic Foodborne Disease in a Rural Community in Mexico. *Clinical Infectious Disease*, **55**: 51-60. <https://doi.org/10.1093/cid/cis300>

Zhang Y, Bi P, Hiller JE. 2010. Climate variations and Salmonella infection in Australian subtropical and tropical regions. *Science of The Total Environment*, **408**: 524-530. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.068>

Zhou Z, Jin X, Zheng H, Li J, Meng C, Yin K, Xie X, Huang C, Lei T, Sun X, Xia Z, Zeng Y, Pana Z, Jiao X. 2018. The prevalence and load of Salmonella, and key risk points of Salmonella contamination in a swine slaughterhouse in Jiangsu province, China. *Food Control*. **87**: 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.026>

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo usados para el aislamiento de *Salmonella*

- Difco™ Base de Caldo de Tetracionato

Contenido (Fórmula aproximada por litro)

Reactivo	Cantidad
Peptona Proteosa	2.5 g
Digerido Pancreático de Caseína	2.5 g
Hiel de Buey	1.0 g
Tiosulfato de Sodio	30.0 g
Carbonato de Calcio	10.0 g

Método de preparación: suspender 4,6 g del polvo en 100 mL de agua purificada y calentar hasta ebullición, enfriar por debajo de 60 °C, agregar 2 mL de solución de yodo (6,0 g de cristales de yodo y 5,0 g de yoduro de potasio en 20,0 mL de agua). No recaliente el medio después de agregar yodo, no autoclave. Usar inmediatamente. Pruebe el rendimiento del producto terminado utilizando cultivos de control típicos y estables. pH final 8.4 ±0.2

- Difco™ Medio MSRV (Semi-sólido Modificado Rappaport-Vassiliadis)

Contenido (Fórmula aproximada por litro)

Reactivo	Cantidad
Triptosa	4.59 g
Caseína Hidrolizada (Ácida)	4.59 g
Cloruro de Sodio	7.34 g
Fosfato de Dihidrógeno Monopotásico	1.47 g
Cloruro de Magnesio (Anhidro)	10.93 g
Oxalato Verde Malaquita	0.037 g
Agar	2.7 g

Método de preparación: suspender 31,6 g del polvo en 1 L de agua purificada, mezclar bien, calentar con agitación frecuente para disolver completamente el polvo, no esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y agregar asepticamente 10 mL de suplemento antimicrobiano Novobiocin y mezclar bien. pH final 5.2 ±0.2

- Difco™ XLT4 Agar Base

Contenido (Fórmula aproximada por litro)

Reactivo	Cantidad
Peptona Proteosa No. 3	1.6 g
Extracto de Levadura	3.0 g
L-Lisina	5.0 g
Xilosa	3.75 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Citrato de Amonio Férrico	0.8 g
Tiosulfato de Sodio	6.8 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	18.0 g
Fenol Rojo	0.08 g

Método de preparación: suspender 59 g del polvo en 1 L de agua purificada. Agregue 4,6 ml de suplemento de agar XLT4, mezcle bien, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Evite el sobrecalentamiento. N autoclave. Pruebe el rendimiento del producto terminado para determinar su rendimiento, utilizando cultivos de control típicos y estables. pH final 7.4 ±0.2

- BD Bioxon Base de Agar Sangre

Contenido (Fórmula aproximada por litro)

Reactivo	Cantidad
Infusión de Músculo Cardíaco (Sólidos)	10.0 g
Peptona de Carne	10.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

Método de preparación: disolver 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada remojar entre 5 y 10 min, hervir durante 1min. Esterilizar a 121°C durante 15 min, después enfriar a 45-50°C y vaciar en cajas Petri estériles. Para el medio suplementado con sangre añadir en proporción de 5% la sangre desfibrinada estéril, homogenizar y vaciar en cajas Petri estériles. pH final 7.3 ±0.2 a 25°C.

Anexo 2. Procedimiento de asilamiento de *Salmonella* en heces y tejidos recuperados de cerdos

1. Toma de muestras en Granjas y tejido (íleon) en Rastro
2. Pesar 1 g de heces, 10 g de íleon o bien 1 ml de líquido, según sea el caso y, depositarlos en 10 ml de caldo Tetrionato (añadir 0.2 ml de solución yodoyodurada previamente), incubar por 48 horas a 37°C.
3. Tomar 0.1 ml de muestra de caldo Tetrionato y colocarla en 9.9ml de Rappaport Vassiliadis (MSRV) con novobiocina. Incubar a 42°C durante 24 horas.
4. Sembrar en agar XLT4 e incubar a 37°C, 24 horas.
5. Observar las colonias desarrolladas, las de coloración negra (presencia de sulfuros), de 1-3 mm de diámetro aproximadamente, resembrar para realizar pruebas bioquímicas.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN con kit comercial InstaGene™Matrix (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

1. Recuperar con un asa bacteriológica algunas colonias bacterianas del medio de cultivo (Base Agar Sangre).
2. Resuspender la colonia en 1000 µl de agua estéril.
3. Centrifugar por un minuto a 10,000-12,000 rpm.
4. Remover el sobrenadante.
5. Añadir 200 µl InstaGene™ Matrix al pellet e incubar a 56°C por 15-30 minutos.
6. Vórtex a máxima velocidad por 10 segundos.
7. Incubar a 100°C por 8 minutos.
8. Vórtex a máxima velocidad por 10 segundos.
9. Centrifugar por 3 minutos a 10,000-12,000 rpm.
10. Use 20 µl del sobrenadante por cada 50 µl de reacción de PCR.
11. Guarde el preparado a -20°C.

Anexo 4. Imágenes capturadas durante la toma de muestras



1. Cerda con lechones en área de maternidad (Granja La Huerta)



2. Cerdos en área de destete (Granja La Huerta)



3. Cerdos en área de destete (Granja Recoveco)



4. Cerdos área de engorda (Granja la Huerta)



5. Cerdos durante el transporte a rastro (Granja la Huerta)

Anexo 5. Imágenes de crecimiento bacteriano en medios de cultivo XLT4



Cultivos de *Salmonella* en agar selectivo XLT-4. Se observan las colonias negras características causadas por la producción de sulfuro de hidrógeno.

Anexo 6. Imagen satelital de granja La Huerta



1 área de ingreso a la granja y oficinas, 2 área de almacén y procesamiento de alimentos, 3 almacén de granos (maíz), 4 área de engorda, 5 área de gestación, 6 área de maternidad, 7 área de destete, 8. área de inseminación.



Los círculos en color azul indican las áreas de las cuales se recolectaron muestras.



Los puntos rojos indican los lugares en los cuales se aislo a *Salmonella*.

Anexo 7. Imagen satelital de granja Recoveco



1 almacén de alimentos, 2 taller y almacén de maquinaria agrícola, 3 área de maternidad, 4 área de destete, 5 área de engorda, 6 área de sementales, 7 área de maternidad. En círculo de color azul se muestran las áreas de donde se recuperaron muestras.



Los puntos rojos indican los lugares en los cuales se aislo a *Salmonella*