

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“Tipificación molecular de aislados de *Salmonella*
entérica subespecie entérica de muestras obtenidas de
sistemas de producción avícola en Perú”**

Daniel Arnaldo Alvarado Pérez

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Lima, Perú

2017

Dedicatoria

A mis abuelos
A mis padres
A mis hermanos

Agradecimiento

Todo mi agradecimiento:

A mi director de tesis, el Dr. Hugo Samamé y asesores por sus sugerencias, ayuda y confianza

.
A mi asesor el doctor Jorge Rodríguez por sus correcciones y acertados aportes

A los doctores y técnicos de Bioservice por su permanente disposición y ayuda.

A mis amigos que con sus diferentes virtudes han aportado en mí

A mis padres y hermanos por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos

RESUMEN

Salmonella entérica es un microorganismo de importancia en salud pública difundido mundialmente y responsable de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), *Salmonella entérica* se caracteriza por su elevada morbilidad, la dificultad de controlar las fuentes de infección, número de serovariedades, patogenia y epizootiología compleja. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido en América Latina la importancia de la salmonelosis como una enfermedad de infección alimentaria y como la mayor causa de diarrea en humanos, por esta razón plantea la necesidad de esquemas y mecanismos de vigilancia. No solo son capaces de infectar al hombre, sino también a una gran lista de especies animales (aves, porcinos, bovinos, ovinos, etc.). En las aves, la *Salmonella* genera enfermedades clínicas características que producen grandes perjuicios a la industria avícola. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico y tipificación basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que son útiles como método de tipificación para estudiar la variabilidad genética de cepas y la relación clonal entre aislados de una misma especie. El presente estudio tuvo por objetivo determinar las serovariedades presentes de *Salmonella entérica* así como la variabilidad genética y la relación filogenética que existe entre varios aislados de muestras obtenidas de sistemas de producción avícola en Perú. Se trabajó con 95 cepas de Salmonelas previamente identificados mediante métodos bacteriológicos clásicos y bioquímicos, las cuales fueron serotipificadas mediante PCR múltiple, los resultados indican la presencia de *Salmonella* serovar *enteritidis* (N= 32; 33.68%), *typhimurium* (N= 15; 15.79%), *infantis* (N= 33; 34.74%) y no tipificadas 15 (N = 15.79%). Un análisis de variabilidad genética fue realizado mediante patrones de REP-PCR, los cuales indican que la variación genética total medida por AMOVA ($V_t=0.3879$) fue explicada en un 61% por diferencias entre serovares ($V_a= 0.2405$) y un 38% por diferencias dentro de los serovares ($V_b=0.1474$). La relación filogenética de los serotipos identificados se realizó mediante dendrograma basado en distancia genética mediante método bayesiano para REP-PCR DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de 80 cepas de *Salmonella enterica*. Se apreció una moderada diferenciación entre los aislados de los tres serovares, los cuales se agruparon en al menos 2 clústeres genéticos, mostrándose mayor variabilidad en el serovar *infantis*.

Palabras claves: salmonella, cepas, tipificación, serovar, variabilidad, genética, dendrograma, prevalencia.

ABSTRACT

Salmonella enterica is a microorganism of public health significance, disseminated worldwide and responsible for food borne diseases. *Salmonella enterica* is characterized by its high morbidity, its difficulty of controlling the sources of infection, number of serovars, pathogenesis and its complex epizootiology. The World Health Organization (WHO) has recognized the importance of salmonellosis as a food borne disease in Latin America and the major cause of diarrhea in humans; therefore it proposes the need of having schemes and monitoring mechanisms. *Salmonella* is not only able to infect men but also a great list of animal species (poultry, pigs, cattle, sheep, etc). In birds, *Salmonella* generates characteristic clinical diseases that cause great damage to the poultry industry.

In recent years, new diagnostic and typification techniques based in the polymerase chain reaction (PCR) which are useful as typing method to study the genetic variability of strains and clonal isolates relationship between the same species have been developed. This study had the aim to determine the serovars of *Salmonella enterica* as well as the genetic variability and phylogenetic relationship between various isolates of samples obtained from poultry production systems in Peru. We worked with 95 *Samonella* strains previosuly identified by classical biochemical and bacteriological methods, then they were serotyped by multiple PCR, the results indicate the presence of *Salmonella* serovar *enteritidis* (N=32; 33.68%), *typhimurium* (N= 15; 15.79%), *infantis* (N= 33; 34.74%) and non-typified (N =15; 15.79%). Genetic variability analysis was performed using REP-PCR patterns, which indicate that the total genetic variation measured by AMOVA ($V_t = 0.3879$) was 61% for differences between serovars ($V_a = 0.2405$) and 38% for differences within serovars ($V_b = 0.1474$). The phylogenetic relationship of the identified serotypes was performed by a dendrogram based on genetic distance using method Bayes REP-PCR for DNA fingerprinting (DNA fingerprinting) of 80 *Salmonella enterica* strains. Moderated differentiation was observed between isolates of the three serovars, which were grouped in at least two genetic clusters, showing greater variability in the serovar *infantis*.

Keywords: Salmonella, strains, typification, serovar, variability, genetic, dendrogram, prevalence

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS	8
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS	9
I. INTRODUCCION	10
I. OBJETIVO.....	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	12
II. HIPÓTESIS.....	13
III. ANTECEDENTES.....	14
4.1 GENERALIDADES	14
4.1.1 Agente etiológico	14
4.1.2 Clasificación	14
4.1.3 Características microbiológicas	15
4.2 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD	15
4.3 EPIDEMIOLOGIA.....	17
4.4 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR SALMONELA	20
4.4.1 La enfermedad en los animales.....	20
4.4.2 La enfermedad en el hombre	20
4.5 MÉTODOS DE DIAGNOSTICO	21
4.6 VARIABILIDAD GENÉTICA EN ENTEROBACTERIAS	23
4.6.1 Variabilidad genética	23
4.6.2 Métodos de caracterización.....	24
4.6.2.1 Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD)	25
4.6.2.2 Secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP-PCR).....	26
4.6.2.3 Secuencias concenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC-PCR)	26
4.6.2.4 Ribotipificación.....	27
4.6.2.5 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	27

4.6.2.6 Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	27
4.6.2.7 Tipificación multilocus de secuencia (MLST)	28
4.6.2.8 MICROMATRICES DE ADN	28
IV. MATERIALES Y METODOS	30
5.1 LUGAR DE ESTUDIO.....	30
4.2 MATERIALES	30
4.2.1 Laboratorio de biología molecular.....	30
4.3 MÉTODOS	31
5.3.1 Cepas de salmonela	31
5.3.2 Reactivación de cepas.....	31
5.3.3 Identificación molecular de serovar de <i>Salmonella</i> entérica.....	31
5.3.4 Extracción de ADN genómico	31
5.5 IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> ENTÉRICA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	32
5.5.1 Identificación molecular de <i>Salmonella infantis</i> mediante PCR	33
5.5.2 Tipificación molecular de serovares de <i>Salmonella</i> entérica subesp. entérica mediante REP-PCR.	33
5.6 ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>SALMONELLA</i> ENTÉRICA SUBESP. ENTÉRICA.	34
V. RESULTADOS	35
6.1 ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA MOLECULAR BASADA EN PCR DE SEROTIPIFICACION.....	35
6.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> ENTÉRICA.	38
VI. DISCUSION	44
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. RECOMENDACIONES	49
IX. BIBLIOGRAFIA	50
X. ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

TABLA 1. VARIANTES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) UTILIZADAS EN EPIDEMIOLOGIA PARA LA TIPIFICACIÓN BACTERIANA.....	25
TABLA 02. NÚMERO Y PORCENTAJES DE SEROTIPOS DE SALMONELA IDENTIFICADOS.....	67
TABLA 03. NÚMERO Y PORCENTAJES DE MUESTRAS QUE LOGRARON SER IDENTIFICADAS.....	69
TABLA 04. NÚMERO Y PORCENTAJES DE <i>SALMONELLA SP.</i> SEROTIPIFICADAS COMO <i>S. INFANTI</i>	70

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

FIGURA 1. ADN GENÓMICO EXTRAÍDO DE SALMONELA M, MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 BP PLUS BLUE, LÍNEA 1-7	
MUESTRAS DE SALMONELA.....	35
FIGURA 2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR SEROTIPOS DE SALMONELA.	36
FIGURA 3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>SALMONELLA INFANTIS</i>	37
FIGURA 4. DENDOGRAMA BASADO EN DISTANCIA GENÉTICA MEDIANTE MÉTODO BAYESIANO PARA REP-PCR DNA	
FINGERPRINTING (HUELLA GENÉTICA DE ADN) DE 80 CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	39
FIGURA 5. DENDOGRAMA BASADO UNA MATRIZ DE SIMILARIDAD ESTÁNDAR MEDIANTE MÉTODO DE NEIGHBOOR JOINING PARA	
REP-PCR DNA FINGERPRINTING (HUELLA GENÉTICA DE ADN) DE 32 CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTÉRICA SEROVAR</i>	
<i>ENTERITIDIS</i>	40
FIGURA 6. DENDOGRAMA BASADO UNA MATRIZ DE SIMILARIDAD ESTÁNDAR MEDIANTE MÉTODO DE NEIGHBOOR JOINING PARA	
REP-PCR DNA FINGERPRINTING (HUELLA GENÉTICA DE ADN) DE 15 CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTÉRICA SEROVAR</i>	
<i>TIPHYMURIUM</i>	41
FIGURA 7. DENDOGRAMA BASADO UNA MATRIZ DE SIMILARIDAD ESTÁNDAR MEDIANTE MÉTODO DE NEIGHBOOR JOINING PARA	
REP-PCR DNA FINGERPRINTING (HUELLA GENÉTICA DE ADN) DE 33 CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTÉRICA SEROVAR INFANTIS</i> .	
.....	43
FIGURA 8. REP-PCR DNA FINGERPRINTING (HUELLA GENÉTICA DE ADN) DE CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTÉRICA SUBESP. ENTÉRICA</i> .	
LÍNEAS 1-23, LINEA M MARCADOR DE PESO MOLECULAR GENERULER 100 BP PLUS DNA LADDER (FERMENTAS). GEL DE	
AGAROSA 1%, TBE 1X.	43
GRAFICA 01. PORCENTAJE DE CADA SEROTIPOS DE SALMONELA IDENTIFICADOS.	68
GRAFICA 02. NÚMERO Y PORCENTAJES DE CEPAS AISLADAS.	68
GRAFICA 03. PORCENTAJE DE MUESTRAS IDENTIFICADAS.....	69
GRAFICA 04. REPRESENTACIÓN EN PORCENTAJE DEL SEROTIPO <i>INFANTI</i>	70

I. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis ocasionada por el género *Salmonella* es reconocida como una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo, siendo un problema en salud pública, por su elevada morbilidad y por la dificultad de controlar las numerosas fuentes de infección ⁴⁴.

La expansión de la industria avícola ha mejorado el suministro de alimentos de origen animal en todo el mundo lo que han conllevado a una creciente importancia del control y vigilancia de esta infección, motivada por el lugar que las aves y los productos avícolas representan en la cadena alimenticia de la población humana ⁶, pues existen factores inherentes a su desarrollo que favorecen la infección, instalación y propagación de esta enfermedad ³³.

La importancia económica de las infecciones producidas por *Salmonella* en las aves de corral, radica en las pérdidas significativas que impactan en los costos del avicultor, en los ingresos y productividad del sistema de producción, en salud pública en caso se produjese una intoxicación alimentaria humana y dificultades en el comercio internacional ³⁶.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud más relevantes. Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETA en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica. Dentro de las bacterias responsables de ETAs, *Salmonella sp.* ocupa un rol preponderante como agente etiológico. La salmonelosis es una enfermedad que tiene una gran prevalencia en poblaciones humanas y animales debido a su distribución ubicua, el creciente número de serovariedades, el amplio rango de hospedadores, su patogenicidad y la compleja epizootiología, razones por las cuales constituye la zoonosis de mayor frecuencia en el mundo, siendo los productos de origen avícola los frecuentemente involucrados en brotes de infección alimentaria en humanos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce en América Latina la importancia de la salmonelosis como una enfermedad de infección alimentaria siendo reconocida mundialmente como la mayor causa de diarrea humana, esto plantea la necesidad de esquemas y mecanismos de vigilancia ⁸⁶, lo cual sumado a una alta proporción de cepas de *Salmonella sp.* con resistencia múltiple a los antibióticos, probablemente debido al excesivo uso de antibióticos en las raciones de animales, (promotores de crecimiento), y el uso indiscriminado de estos medicamentos en humanos y animales ¹⁰⁵ se convierte en un patógeno de alta importancia en salud pública.

En los países en desarrollo, la carne de ave se ha convertido en un alimento popular por ser una fuente relativamente barata de proteína de buena calidad ⁶⁸. La globalización, la apertura económica y el desarrollo de la industria avícola han permitido un incremento de la producción, distribución y consumo, y por ende la posible transmisión de patógenos como *Salmonella sp.*⁸⁶.

En el Perú los sistemas de producción avícola registraron un crecimiento de 2,7% durante el año 2013, lo cual se tradujo en venta de 1'202.614 toneladas métricas de carne de ave; según el Ministerio de Agricultura, para el año 2014 el sector avícola peruano mantiene un importante y sólido desarrollo y crecimiento continuo durante la última década (2004-2013), con un incremento promedio anual de 8.2%. Este crecimiento se traduce en un incremento del consumo per cápita de ave y huevo llegando a cifras de 41 kg de carne de ave y 70 kg en el departamento de Lima, habiéndose incrementado en más de 90% su consumo en los últimos 10 años (2004-2013), estos valores están ubicados entre los más altos de la región, solo por debajo de Brasil (58 kg.). Similar tendencia se aprecia en el consumo del huevo también aumento, llegando a 167 unidades por persona al año creciendo en 10% respecto al 2012, que fue de 148 unidades.

Sin embargo, a pesar de la importancia de ETAS, especialmente Salmonela, del creciente mercado de la carne de ave, y del crecimiento de los sistemas de producción aviar en el Perú hay un número reducido de estudios de la prevalencia de Salmonela en aves de corral provenientes de sistemas de crianza tecnificada, careciendo con información sanitaria completa de esta enfermedad en este sector. Un estudio de caracterización completo es fundamental para conocer esta enfermedad con la finalidad de formular, implementar y evaluar la eficacia de las estrategias oficiales para su control a nivel nacional.

I. OBJETIVO

Tipificar molecularmente cepas de *Salmonella sp.* aisladas de sistemas de Producción avícola del Perú durante los años 2013 y 2014.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar los diferentes serovares de *salmonella entérica* provenientes de sistemas avícola de diferentes zonas del Perú.
- Determinar la variabilidad genética intraespecifica mediante técnica de REP-PCR ADN fingerprinting.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre cepas de *Salmonella entérica* la variabilidad genética.

II. HIPÓTESIS

Existe baja variabilidad genética, en cepas de *Salmonella sp.* obtenidas de sistemas de producción avícola en el Perú.

III. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades

4.1.1 Agente etiológico

El género *Salmonella* está constituido por bacilos cortos Gram negativos no esporoformadores, anaerobios facultativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen ⁶³. Con la excepción de la serovariedad *S. gallinarum* *S. pullorum*, son móviles gracias a sus flagelos peritriticos. Estos microorganismos crecen en un amplio rango de temperatura (7°-48° C) a un pH entre 4 y 8, y con actividades de agua (aw) por debajo de 0.933 ⁹⁰

4.1.2 Clasificación

De acuerdo con la actual nomenclatura, que refleja avances recientes en la taxonomía, el género *Salmonella* incluye solo dos especies importantes: *S. entérica* y *S. bongori* ⁶⁵. Se ha propuesto también una supuesta tercera especie, *S. subterranea*, tras el aislamiento de una única cepa ambiental poco usual. *Salmonella entérica* se divide en seis subespecies, que se distinguen por algunas características bioquímicas, y algunas de ellas se corresponden con subgéneros anteriores ⁶⁵. Estas subespecies son:

<u>Subgéneros originales</u>	=	<u>Nomenclatura Actual</u>
Subespecie I	=	subespecie <i>enterica</i>
Subespecie II	=	subespecie <i>salamae</i>
Subespecie IIIa	=	subespecie <i>arizonae</i>
Subespecie IIIb	=	subespecie <i>diarizonae</i>
Subespecie IV	=	subespecie <i>houtenae</i>
Subespecie VI	=	subespecie <i>indica</i>

El símbolo V se reserva a los serotipos de *S. bongori* a fin de evitar confusiones con el nombre de serotipo de *S. enterica subesp. enterica*. Las cepas de *Salmonella* se clasifican en serotipos según la gran diversidad de los antígenos (O) del lipopolisacárido (LPS) y de los antígenos proteicos de

los flagelos (H), de acuerdo con la clasificación de Kauffmann–White; en la actualidad se reconocen aproximadamente 2.500 serotipos ⁷¹

Los serotipos más comunes que causan infección en humanos y en animales de abasto pertenecen a la subespecie *enterica*. Los serotipos de las otras subespecies tienen mayor probabilidad de presentarse en animales poiquilotermos (de sangre fría) y en el ambiente, pero a veces se les asocia con la enfermedad en humanos. Algunos serotipos de las subespecies *S. arizonae* y *S. diarizonae* se han asociado con enfermedades en los pavos y en las ovejas, y otros pueden ser transportados por reptiles y anfibios silvestres o en cautividad ⁶⁵.

Solo se conservan los nombres para los serotipos de la subespecie entérica. Estos nombres no deben escribirse en cursiva. La primera letra es mayúscula. En la práctica clínica, no es necesario indicar el nombre de la subespecie, ya que solamente llevan nombre los serotipos de la subespecie *entérica*; por ejemplo, *typhimurium*, *London*, o *Montevideo* son serotipos de la subespecie *entérica*. En la práctica rutinaria, se puede usar el género *Salmonella* seguido del nombre del serotipo (ej. *Salmonella typhimurium*). La mayor parte de los serotipos de otras subespecies se designan mediante una fórmula antigénica que incluye la subespecie, designada mediante números romanos (ej. *Salmonella* IV 48:q.z51)

También se dan cambios de forma regular en la clasificación de los serotipos a medida que se dispone de nueva evidencia sobre el parentesco genético, ej. *S. pullorum* se clasifica actualmente como *S. gallinarum* serotipo *pullorum* ⁶⁵.

4.1.3 Características microbiológicas

El género *Salmonella* se incluye en la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de la enterobacteria: son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativo y suelen ser móviles; representa una excepción *Salmonella gallinarum*, siempre inmóvil ⁹⁰⁻²⁻²¹⁻⁵⁰

4.2 Factores de virulencia y patogenicidad

La virulencia de salmonela se relaciona primero con tener una tolerancia a los ácidos para sobrevivir el pH del estómago, también con su capacidad de adhesión y colonización a las células intestinales promovidos por factores de virulencia (fimbrias específicas, adhesinas bacterianas codificadas por cromosomas de superficie, hemaglutininas e inducción de células epiteliales de polipéptidos bacterianos), y resistir tanto la digestión por los fagocitos como la destrucción por la acción del complemento ⁷³⁻⁹⁰⁻³⁴

Tras producirse la adhesión a la superficie de las células de la mucosa intestinal, a través de fijación mediante fimbrias específicas, la bacteria produce una ondulación de las membranas celulares. Esto favorece su ingreso en forma de vesículas formadas por la propia membrana que a menudo llegan a coalescer. El microorganismo se multiplica en estas vesículas y puede ser eliminado de las células que sufren sólo un daño ligero o transitorio ⁷³.

El complejo de invasión es mediado por los productos de la expresión de varios genes cromosómicos localizados en islas de patogenicidad conocidas como SPI ⁴⁰. Se cree que estos genes han sido adquiridos por otras especies de bacterias de salmonela a través de una transferencia horizontal de genes Y el rol en la patogénesis de algunos SPI está definido, pero la función en la virulencia de muchos genes con SPI aún se desconoce. ²¹

Las islas de patogenicidad están constituidas por un grupo de genes envueltos en la codificación de factores específicos de virulencia¹³. Se han descritos diecisiete islas de patogenicidad (SPI-1 a SPI-17), las más estudiadas son las SPI- 1 y SPI-2. Las islas de patogenicidad 1 y 2 son los dos mayores determinantes de virulencia de *S. entérica* ²⁸, porque codifican los sistemas de secreción de tipo III. La isla de patogenicidad SPI-1 promueve la invasión de las células epiteliales intestinales y la iniciación de la respuesta inflamatoria en el tracto intestinal, asimismo, está envuelta en la sobrevivencia y persistencia de la bacteria a nivel sistémico del hospedero⁸⁴. En relación a la SPI-2, la primera actividad descrita fue la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos que constituyen los mayores reservorios para la diseminación de la bacteria sistémicamente en los órganos del hospedero ⁹³⁻²⁸.

La proteína invA dependiente del gen de invasión (invA) es considerada una de las más importantes para el ensamblaje del SSTIII. Se ha discutido también que las salmonelas difieren en la habilidad de multiplicarse dentro de varios tipos celulares, y que esta bacteria puede escoger no replicar en ciertos tipos celulares ³⁸.

La capacidad de crecer en el interior de las células hospedadoras depende de la presencia de plásmidos de virulencia ⁷³, los cuales se relacionan con la supresión general de la respuesta inmune del huésped. Se han confirmado estos plásmidos en *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. cholerasuis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarumpullorum* y *S. abortus ovis*, pero son notablemente ausentes en *S. typhi*, la cual es adaptada al huésped y muy infecciosa ³⁴.

Además presenta resistencia a la digestión de los fagocitos y a la acción de complemento que facilita la difusión de salmonela por el organismo del hospedador ³⁴.

La resistencia a la acción del complemento depende en parte de la longitud de las cadenas lipopolisacáridicas del antígeno O (LPS). El LPS es responsable de los efectos endotóxicos de la salmonelosis y puede contribuir a la respuesta inflamatoria local que daña las células del epitelio intestinal y da lugar a la aparición de la diarrea ⁷³⁻³⁴.

Las sideróforas son necesarias para la acumulación de la cantidad suficiente de hierro ambiental para permitir el crecimiento de salmonela, así también las porinas aumentan la virulencia de salmonela mediante la represión del macrófago y la fagocitosis dependiente de polimorfonucleares, sin embargo pueden tener una importancia limitada en la patogenicidad ³⁴.

Gracias a las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica a tiempo real (RT-PCR), como otras pruebas moleculares han ayudado a la detección de pseudogenes, profagos funcionales, islas e islotes de patogenicidad y sistemas de secreción, para la investigación y nuevos hallazgos de esta bacteria.

4.3 Epidemiología

Desde el punto de vista epidemiológico, Salmonela se puede clasificar en tres grupos principales. El primer grupo comprende *Salmonella typhi* y *paratyphi* A y C, que infectan solo al hombre y se propagan en forma directa o indirecta (por medio de alimentos o agua) de una persona a otra. El segundo grupo incluye serovariedades adaptadas al huésped en especies particulares de vertebrados como *S. gallinarum*, *dublin*, *cholerasuis*, etc. El tercer grupo está formado por la mayoría de las demás serovariedades de salmonela sin ninguna preferencia particular por el huésped, que infectan al hombre y a los animales, en este grupo están los principales agentes de la salmonelosis que ocurren hoy en día ⁶⁸.

Se ha visto que muchos serotipos originan intoxicaciones alimentarias en humanos, y los trabajadores que asisten a los animales, los veterinarios y los empleados de mataderos, pueden infectarse directamente en el trabajo, así como el personal de laboratorio ⁶⁵.

Las infecciones por salmonela son más frecuentes en verano que en invierno, probablemente debido a que el ambiente templado es más favorable para el crecimiento de los microorganismos sobre los alimentos. ⁶⁹⁻⁵⁷

En los países en desarrollo la gravedad del problema de las enteritis zoonóticas está todavía sin determinar. En algunas zonas urbanas de los países en desarrollo, donde se consumen de ordinario alimentos elaborados industrialmente, los casos de salmonelosis en el hombre, especialmente en adultos, son más comunes que en las zonas rurales ⁶⁸.

El hábitat principal de *Salmonella sp.* es el tracto intestinal de animales tales como las aves, los reptiles, los animales de granja, las personas, y de vez en cuando los insectos. Los organismos son excretados en las heces, desde las cuales pueden ser transmitidos por insectos y por otros seres vivos a un gran número de sitios, también se pueden encontrar en el agua, de modo especial en el agua contaminada¹⁶⁻⁸⁹. Cuando el agua contaminada y los alimentos que han sido contaminados por insectos o por otros medios son consumidos por personas y por otros animales, estos organismos son diseminados otra vez por la materia fecal, continuando de esta forma el ciclo⁵⁰.

Las infecciones de animales de abasto por salmonela tienen un papel importante en la inocuidad alimentaria⁸⁹, ya que los alimentos de origen animal se consideran como la fuente principal de infecciones por salmonela en el hombre⁷⁷. Se han realizado programas especiales para el control de aves, cerdos y ganado bovino, que incluyen el control de animales sanos que pueden ser portadores subclínicos de estos microorganismos⁶⁵⁻⁶⁸. También se controla la contaminación cruzada durante el procesamiento de los alimentos, ya que puede ocurrir contaminación por manipuladores de alimentos sanos.

La salmonela constituye un género bacteriano difundido mundialmente y con importancia predominante en la salud pública⁷⁴⁻⁵². Esta bacteria es reconocida mundialmente como la mayor causa de diarrea en humanos, siendo los productos avícolas uno de los mayores vehículos de la infección por *Salmonella sp.*

Se ha averiguado que hasta el 70% de las canales de broiler están contaminadas con salmonela, parece ser que los organismos no forman parte de la flora normal de las aves de corral sino que son adquiridos del ambiente por medio de insectos, roedores, piensos, otros animales y personas⁵⁰. Las aves de corral y sus productos son vehículos alimenticios comunes de esta enfermedad en muchos países.

En aves existen básicamente dos tipos de infecciones por salmonela, sistémica y entérica. Infecciones sistémicas con *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* representaron durante muchos años un serio problema en la industria avícola. Estos agentes fueron controlados y erradicados en muchos países, gracias a programas oficiales de prevención y control, que fueron implementados en algunos países como resultado de la globalización y de la apertura de los mercados. *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* y otras, son especies ubicuas no tifoideas que pueden afectar cualquier especie, inclusive aves y el hombre. Las aves pueden ser asintomáticas, por la colonización entérica de estas bacterias. La susceptibilidad disminuye con la edad y las aves adultas pueden convertirse en portadoras⁷⁸.

En un estudio de prevalencia de serotipos de salmonela en granjas avícolas tecnificadas en el Perú por el SENASA en el 2014, los resultados muestran que de las 550 avícolas muestreadas en el estudio 162 dieron positivo a salmonela, estimándose en una prevalencia del 29.78% \pm 2.89. Se encontró que las regiones con mayor número de granjas positivas a salmonela son Pasco (66.66%), Piura (66.66%) y San Martín (41,66%) y las regiones con menor número de granjas positivas fueron Loreto (8.33%), Lambayeque (13.04%) y Ucayali (13.33%). Teniendo en cuenta la densidad poblacional y el tamaño muestral colectado, las regiones con mayor prevalencia son la Libertad y San Martín.⁹¹⁻⁹²

Respecto al tipo de explotación, se encontró que las granjas avícolas de carne presentaron una mayor prevalencia respecto a los otros tipos de explotación (48.71%), seguidas por las de postura comercial (13.16%) y finalmente de reproductoras (6.02%)⁹¹⁻⁹².

Además el número de granjas positivas por tipo de explotación y región, se encontró que para el caso de granjas de carne; Ancash, Piura, y La Libertad (75%, 75%, 73% respectivamente) fueron las regiones con la mayor prevalencia y las regiones de Ucayali (18.18%) y Loreto (5.56%) los de menor prevalencia⁹¹⁻⁹². En cuanto a las granjas de postura comercial, Piura (50%), Tacna (37,5%) y Lima (20,37%) fueron los de la más alta prevalencia y Lambayeque (5.26%) el de menor prevalencia. En relación a granjas de aves reproductoras, Lima fue el que mayor proporción de granjas con aislamientos de salmonela (11.54%).⁹¹⁻⁹²

En este estudio se identificaron siete serotipos diferentes. Más de un serotipo fue aislado en catorce de las explotaciones, *S. infantis* se aisló en 148 granjas avícolas, *S. enteritidis* se aisló en 9 granjas, *S. seftenberg* se aisló en 7 granjas avícolas, *S. entérica* cepa rugosa se aisló en 5 granjas, *S. derby* se aisló en 3 granjas, al igual que *Kentucky* y *S. agona* se aisló en una granja⁹¹⁻⁹². El número de granjas con serotipos aislados de salmonela fueron Lima (43.18%), La Libertad (16.48%), Ica (7,95%), Arequipa (7.39%), San Martín (6.25%), Tacna (6.25%) Madre de Dios (2.84%), Piura (2.27%), Ancash (1,7%), Lambayeque (1,7%), Loreto (1,14%), Ucayali (1,14%), Pasco (1,14%) y Junín (0.57%).⁹¹⁻⁹²

En granjas de carne se aislaron *S. infantis* en 128 granjas establecimientos (91.43%), mientras que en granjas de postura comercial la prevalencia de *S. infantis* fue del 54.84% y granjas de reproductoras de 60%⁹¹⁻⁹².

4.4 Enfermedades producidas por salmonela

4.4.1 La enfermedad en los animales

Las infecciones de animales de abasto por salmonela tienen un papel importante en la salud pública y particularmente en la seguridad alimentaria ya que los alimentos de origen animal se consideran como la fuente principal de infecciones por salmonela en el hombre⁶⁵. En los animales, el pienso contaminado es la fuente más importante de infección⁶⁵, aunque también puede ser por transmisión directa de un animal a otro, por medio de huevos infectados y por contaminación del medio ambiente (suelo, roedores, insectos, agua, etc.)⁶⁸. La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos así como animales silvestres, siendo los más susceptibles los animales jóvenes, en estado de gestación, o lactantes⁶⁵.

Se han determinado las principales causantes de salmonelosis clínica en las diferentes especies animales, como en los bovinos, con los serotipos *dublin* y *typhimurium*; en los cerdos, el serotipo *cholerasuis*; en ovinos y caprinos, los serotipos *abortus ovis* y *typhimurium*; en equinos, los serotipos *abortus equi* y *typhimurium*; en perros y gatos, se han distinguido numerosos serotipos y finalmente en las aves, por los serotipos *gallinarum-pullorum*, *enteritidis* y *typhimurium*². La infección puede manifestarse clínicamente o no. En la forma subclínica, el animal puede tener una infección latente y albergar el patógeno en sus ganglios, o puede ser portador y eliminador del agente por las materias fecales, en forma transitoria, intermitente o persistente². La OMS ha dividido las manifestaciones clínicas en animales en tres clases de infecciones como: patognomónicas, con síntomas clínicos y asintomáticos. Las infecciones con manifestaciones clínicas patognomónicas, son las que causan aborto en el ganado vacuno, caballos y ovejas. Las infecciones con síntomas clínicos que indican solo una salmonelosis, ocurren con frecuencia y pueden ser causadas por cualquiera de las serovariedades de salmonela; a menudo se presentan cuadros de septicemia, debilidad, postración, fiebre y diarrea².

Finalmente, la infección asintomática, se caracteriza por que los individuos contaminados no tienen manifestaciones clínicas aparentes⁶⁸.

4.4.2 La enfermedad en el hombre

En el hombre, los organismos del género salmonela son agentes etiológicos de infecciones intestinales y sistémicas, por lo general, como contaminantes secundarios de los alimentos, de origen ambiental o como consecuencia de septicemias en animales de consumo. La salmonelosis humana es la enfermedad zoonótica más frecuente e importante causada por estos organismos⁶⁵.

La salmonelosis en el hombre causa una infección intestinal que se caracteriza por un período de incubación de seis a 72 horas después de la ingestión del alimento, y una instalación brusca de fiebre, mialgias, cefalalgia y malestar. Los síntomas principales consisten en dolores abdominales, náuseas, vómitos y diarrea. Por lo común, la salmonelosis tiene un curso benigno y la recuperación clínica sobreviene en dos a cuatro días. El portador convalesciente puede eliminar la bacteria durante semanas y, en algunos casos puede hacerlo durante algunos meses. La deshidratación puede ser grave, por lo que se recomienda la rehidratación y la reposición de electrolitos².

La sintomatología de la enfermedad con manifestación enterocolítica es la más frecuente, y es producida generalmente por los serotipos *enteritidis* y *typhimurium*. No obstante, cuando la sintomatología con manifestaciones sistémicas exhibe una predilección hacia septicemia, los agentes involucrados son por lo general *S. dublin* y *S. choleraesuis*⁶⁸⁻⁷⁵⁻³⁴.

Si bien la salmonelosis puede afectar a personas de cualquier edad, la información epidemiológica indica que la susceptibilidad es más alta en los infantes, ancianos y huéspedes inmunocomprometidos³⁴. La dosis requerida para producir enfermedad varía con muchos factores. Diferentes serotipos pueden tener diferentes dosis de respuesta, generalmente se ha reconocido que la dosis para producir enfermedad con altas tasas de ataque está en un rango de 10⁵ a 10⁷ células²¹.

4.5 Métodos de diagnóstico

La detección de salmonela requiere una cuidadosa interpretación a la luz de conceptos similares pero diferentes, como son infección, enfermedad, transmisión, excreción, portador fecal o reservorio. La mayoría de las técnicas de diagnóstico de laboratorio carece de la sensibilidad mínima para poder establecer los criterios que encuadren estos conceptos⁹⁰.

Existen muchos protocolos diferentes para el aislamiento y la identificación, básicamente todos ellos cuentan con un paso de pre-enriquecimiento de la muestra en agua peptonada; un segundo paso de enriquecimiento en un medio líquido selectivo para salmonela, y finalmente, el aislamiento en dos o más medios selectivos sólidos en placa. Se determinan los resultados mediante pruebas bioquímicas y se confirman con polisueros anti-salmonela. Todos los medios de cultivo preparados deben someterse a controles de calidad para permitir el crecimiento del microorganismo sospechoso⁶⁵.

El motivo del empleo de varios medios selectivos en placa (a veces incluso se utiliza más de uno de enriquecimiento) se debe al hecho de que no todos los serotipos son capaces de crecer adecuadamente en todas las clases de

medios de cultivo; de esta manera, aumentamos las probabilidades de aislar cualquier serotipo presente en la muestra ⁹⁰.

Cuando se espera encontrar sólo un pequeño número de salmonela, el agua peptonada permitirá que se multipliquen las salmonelas y no mueran por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento, ayudando en algunos casos a la recuperación de la bacteria en los casos en que presente daños subletales, como los debidos a la congelación, el calentamiento, la exposición a sustancias microbicidas o por desecación. Por lo general este pre enriquecimiento se realiza añadiendo a la muestra 10 volúmenes de agua peptonada, luego de lo cual será incubada durante 16 a 24 horas a 37°C ⁶⁵. Los medios de enriquecimiento son medios líquidos o semisólidos que contienen sustancias que permiten el crecimiento selectivo de salmonela a la vez que inhiben el crecimiento de otras bacterias. Se han utilizado temperaturas elevadas para aumentar la selectividad del medio de enriquecimiento, en algunos laboratorios se utiliza una temperatura de 43°C ⁶⁵. La composición del medio, la temperatura, la duración de la incubación, y el volumen de las muestras utilizadas como inóculo del medio, pueden servir para mejorar la tasa de aislamiento, y se debe tener siempre en cuenta estas variables. Como ejemplos de medios selectivos de enriquecimiento tenemos al caldo tetrionato, caldo selenito F, caldo selenito cistina, caldo Rappaport-Vassiliadis. A 10 ml de caldo selectivo se le inocula 1 ml del medio de pre enriquecimiento (agua peptonada) y se incuba a 43°C ⁴⁸⁻⁶⁵. Los medios selectivos son medios sólidos de agar que se colocan en placas petri y que permitirán el crecimiento diferencial de las bacterias. Se caracterizan por inhibir el crecimiento de bacterias diferentes a salmonela y suministrar información sobre algunas de las principales características bioquímicas diferenciales (como la incapacidad de fermentar lactosa o la producción de sulfuro de hidrógeno). Los resultados se obtienen después de 24 ó 48 horas de cultivo a 37°C. Ejemplos de medios selectivos sólidos son el agar verde brillante, el agar xilosa-lisina-desoxicolato, el agar desoxicolato/citrato, el agar Rambach y el agar sulfito de bismuto, entre otros⁶⁵.

Los serotipos adaptados a hospedadores aviares (*S. pullorum* y *S. gallinarum*). También crecen en estos medios selectivos y de enriquecimiento, aunque en algunos laboratorios existen problemas de toxicidad, por ejemplo, los caldos de selenito y tetrionato pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas de *S. pullorum* y *S. gallinarum*⁹⁰.

Para confirmar la identificación se utilizan pruebas bioquímicas utilizando medios compuestos como el TSI, Caldo úrea, LIA, Medio SIM, Citrato, Prueba de Indol ó pruebas bioquímicas comerciales como el API⁶⁵. Con la confirmación serológica se puede identificar la especie, para esto se utiliza el suero polivalente O y el suero polivalente H, considerando como positivo la aglutinación del cultivo mezclado con el respectivo antisuero⁷⁰.

El uso de reacciones antígeno-anticuerpo para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su

constitución antigénica (variedad de antígenos en los componentes estructurales de la célula), aún entre grupos de microorganismos relacionados e involucra la identificación de antígenos somáticos de superficie (LPS, antígenos O) y antígenos flagelares (proteínas, antígenos H)¹⁰³.

La identificación de las serovariedades surge de la combinación antigénica de factores somáticos O y flagelares H, con el agregado del antígeno capsular Vi para algunas serovariedades¹⁸.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas²⁴.

Así tenemos diferentes técnicas como, la PCR que utiliza cebadores arbitrarios (A P-PCR), y la PCR que utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (Rep-PCR) son las técnicas de PCR más utilizadas para tipificar bacterias y hongos, estas son sencillas de realizar, rápidas y poseen un elevado poder de discriminación. También tenemos el estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) esta tipificación posee mayor discriminación y reproducibilidad que las anteriores, pero es más laboriosa, costosa y requiere personal especializado.
24-77

La mayoría de las técnicas moleculares basadas en la PCR son menos laboriosas, más rápidas y más fáciles de realizar e interpretar. Pero se suele pensar que son más costosos.

4.6 Variabilidad genética en enterobacterias

4.6.1 Variabilidad genética

El estudio de la variabilidad genética en enterobacterias constituye un punto clave para el entendimiento de los patrones de adaptación de los microorganismos a cambios en su medio ambiente como puede ser la presencia continua de antibióticos. Se conoce que las bacterias generan biodiversidad como respuesta a estímulos como la presencia de desinfectantes y antibióticos, la presencia de variabilidad genética constituye un requisito clave para la selección y surgimiento de clonas bacterianas con resistencia antimicrobiana y mejor adaptadas. Salmonella constituye un patógeno con alta capacidad de adaptación, demostrándolo con una amplia gama de hospederos y una alta patogenicidad. Un gran número de investigaciones dirigidas a estudiar la diversidad genética en aislados de

salmonela se han realizado en diferentes partes del mundo, por citar un estudio de variabilidad genética en cepas provenientes de hígados de pollo destinado a consumo humano en México (Toluca) reporta una moderada similitud entre aislamientos incluso entre diferentes mercados de abasto demostrando la utilidad como herramienta para la identificación, trazabilidad y procedencia de cepas aisladas⁸⁷.

4.6.2 Métodos de caracterización

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en el mismo principio general común a todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos²⁴.

Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la PFGE, y permiten trabajar con un mayor número de muestras. Las técnicas de PCR son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, pero son menos discriminativa que la técnica electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE) para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas clonalmente²⁴.

Estas técnicas pueden presentar problemas metodológicos relacionados con la inhibición de la PCR y la contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Algunas de estas técnicas tienen que ser validadas en el laboratorio (estandarización de protocolos, equipos y reactivos) debido a que presentan una baja reproducibilidad, mientras que otras técnicas pueden requerir un software adecuado para analizar patrones de bandas de ADN que son complejos y difíciles de interpretar visualmente. Otros problemas son los criterios utilizados para interpretar los patrones de bandas y la dificultad para comparar los patrones de ADN entre varios geles, aunque esto último puede resolverse con la utilización de programas informáticos que analizan automáticamente los patrones y los junta en agrupaciones (clusters)²⁴.

Tabla 1. Variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizadas en epidemiología para la tipificación bacteriana.

<p>Pcr sin digestión posterior con ezimas de restricción (ER) (Amplificación múltiple).</p>	<p>Amplificación múltiple arbitraria: PCR mediante cebadores arbitrarios (AP-PCR, RAPD...) Amplificación múltiple definida: PCR utilizando como cebadores secuencias repetidas encontradas a lo largo del genoma (REP-PCR, ERIC-PCR, Tnra-PCR, BOX-PCR, IS...).</p>
<p>PCR con digestión posterior con ER y comparación de los fragmentos de restricción generados (PCR-RFLP).</p>	<p>PCR con digestión posterior con ER. PCR-RFLP de genes específicos. PCR con digestión con ER previa a la amplificación. Amplificación secuencias de ADN que flanquean lugares de restricción infrecuentes (IRS). Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP).</p>
<p>PCR y posterior secuenciación.</p>	<p>Amplificación y secuenciación de varios loci genéticos (Multilocus sequence typing)</p>

Tomado de SEIMC, 2005.

4.6.2.1 Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD)

En la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) o PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR) se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja estrictancia (temperatura de anillamiento a 36-45 °C y $> 2 \text{ mM MgCl}_2$)¹⁰¹

Las ventajas más interesantes de la AP-PCR son su rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo coste. Existen diversos estudios que indican que la AP-PCR posee una baja reproducibilidad (sobre todo cuando se comparan patrones de bandas entre laboratorios diferentes), por lo que es recomendable que esta técnica se valide y se optimice en cada laboratorio. La baja reproducibilidad de la AP-PCR se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, el tipo de termociclador, la concentración de molde de ADN, la temperatura de anillamiento la concentración de iones magnesio, etc.¹⁰¹

En general, la AP-PCR suele tener un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de varios cebadores y mediante la optimización de la PCR. La AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios para tipificar bacterias (*Staphylococcus aureus resistente a meticilina*, *enterobacterias*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*, etc.) y hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*).⁹⁴⁻⁵⁴

4.6.2.2 Secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP-PCR)

La rep-PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias grampositivas y hongos⁹⁶. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias REP, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN⁹⁶.

La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo coste, una vez que se dispone de un termociclador⁹⁶.

Los patrones de bandas suelen ser sencillos, como en *A. baumannii*, aunque en otros microorganismos, como *Escherichia coli*, la interpretación de los patrones es algo más dificultosa, debido a la proximidad que existe entre algunas bandas y al mayor número de bandas. Esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE, aunque para algunas bacterias, como *A. baumannii*, se ha visto que la REP-PCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE y superior al de la AP-PCR. Estudios realizados por Tenover y colaboradores, y Van Belkum indican que la Rep-PCR es tan discriminatoria como la AP-PCR y el PFGE para tipificar *S. aureus*.³⁵ El poder de discriminación de la REP-PCR puede incrementarse con la utilización de cebadores fluorescentes²⁷, aunque esto encarece bastante la técnica debido a que se necesita un secuenciador automatizado de ADN para analizar los patrones de bandas de ADN.

4.6.2.3 Secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC-PCR)

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gramnegativas, como *A. baumannii*⁴¹.

Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR³⁵.

4.6.2.4 Ribotipificación

La PCR-ribotipificación se basa en la amplificación de las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16S y 23S⁶⁷⁻⁹⁵. Esta técnica es reproducible aunque posee un poder de discriminación bajo, que puede incrementarse con la utilización de enzimas de restricción. En el estudio realizado por Vila y colaboradores, se ha observado que el análisis de los patrones de restricción de los amplificadores de los genes ribosomales (ARDRA) y/o las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16S y 23S es una técnica con un poder de discriminación bastante inferior a de la AP-PCR, la ERIC-PCR y el PFGE³⁵.

4.6.2.5 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas⁶⁷⁻⁹⁵. Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma (p. ej., gen *coa* que codifica para la coagulasa o el gen *s* que codifica para la proteína A de *S. aureus* resistente a meticilina), por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de los métodos de tipificación citados anteriormente. En general, el poder de discriminación de esta técnica depende de una serie de factores como la especie del microorganismo, el gen analizado y el tipo de enzima de restricción. El poder de discriminación de la técnica de PCR RFLP es inferior al de la PFGE aunque puede incrementarse utilizando varias enzimas de restricción. La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción³⁵.

4.6.2.6 Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción (generados a partir de ADN cromosómico) a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos. Existen variaciones metodológicas del AFLP, dependiendo del número de cebadores (normalmente se utilizan 1 ó 2), del tipo de marcaje de los cebadores (radiactivo o fluorescente) y del número de enzimas de restricción utilizadas (1 ó 2). Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear 2 enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. Las ventajas más interesantes de este método son su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. La técnica de AFLP suele ser menos discriminativa que el

PFGE, aunque para algunos microorganismos, como *Enterococcus faecium*, se ha observado que el poder de discriminación de ambos métodos son muy similares. En cepas de *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, se ha observado que el AFLP es mucho más discriminativo que la PFGE.³⁵ Entre los principales inconvenientes de esta técnica hay que destacar su laboriosidad, el elevado coste del equipo (se requiere un secuenciador automatizado de ADN), la obtención de patrones de bandas complejos (entre 30 y 50 fragmentos de distinto tamaño) y el análisis de los mismos. Con un software adecuado. Todo esto hace que el AFLP se utilice fundamentalmente en centros de referencia.³⁵

4.6.2.7 Tipificación multilocus de secuencia (MLST)

El MLST es una técnica desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente), aunque ha sido ocasionalmente utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc). El método está basado en el análisis de isoenzimas (multilocus enzyme electrophoresis - MLEE-), en el que se estudia la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. Las variaciones observadas en dichas movilidades se corresponden con variaciones en el locus o gen codificante de cada enzima. Cada variante es definida como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético.²⁴

Esta medición “indirecta” del polimorfismo genético se convierte en una medición directa en MLST, donde el análisis se basa en la secuencia del ADN de fragmentos internos de genes “housekeeping” que codifican enzimas metabólicas. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables.²⁴

4.6.2.8 MICROMATRICES DE ADN

Los microchips, microarrays o micromatrices de ADN son una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. Estas sondas pueden ser oligonucleótidos o productos de PCR. El ácido nucleico diana que será detectado puede ser ADN o ARN. La principal ventaja con respecto a otras técnicas de biología molecular como la PCR convencional, la PCR múltiple o la PCR a tiempo real es que podemos detectar en un único proceso miles de genes. Podríamos considerar las

micromatrices de ADN como dot blots miniaturizados. Los términos microchips de ADN o microarrays de ADN se utilizan muchas veces indistintamente. Sin embargo, la diferencia fundamental está en la metodología utilizada para la preparación de ambos. Los microarrays de ADN consisten en cientos o miles de productos de PCR u oligonucleótidos específicos de los genes que queremos detectar, los cuales en una minúscula cantidad (<1 nL) se depositan normalmente encima de un sustrato de cristal (por ejemplo un portaobjetos) mediante la utilización de un robot, mientras que los microchips se preparan mediante la síntesis de oligonucleótidos “in situ” sobre un cristal mediante una reacción fotoquímica, parecida a la fotolitografía. Este sistema fue utilizado por primera vez por Affymetrix, que acuñó el término de Genechip²⁴.

Hoy día disponemos de algunas técnicas de tipificación basadas en la PCR que pueden utilizarse como método preliminar para el estudio de la relación clonal entre microorganismos de una misma especie. La elección de la técnica más adecuada depende de muchos factores, de los que los más importantes son los de tipo técnico (técnica rápida, poco laboriosa, fácil de interpretar y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y económico.

IV. MATERIALES Y METODOS

5.1 Lugar de estudio

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Laboratorio de Diagnostico BIOSERVICE S.R.L. ubicado en Villa María del Triunfo. Un total de 95 aislados de *Salmonella sp.* procedentes de casos clínicos provenientes de: Arequipa, Cañete, Chincha, Chancay, Ica, Lima, Pucallpa, Puerto Maldonado y Trujillo, durante el periodo del 27 de febrero del 2013 al 30 de Noviembre del 2014, de pollos engorde (N= 30), gallinas de postura (N=27) y reproductoras (N=20), así como de huevos comerciales (N=10) y de alimentos (N=8) fueron liofilizados y almacenados hasta su utilización.

Un total de 95 cepas liofilizadas de *Salmonella entérica subsp. entérica* fueron reactivadas para el estudio y posteriormente analizadas durante los meses de Diciembre del 2014 a MAYO del 2015.

4.2 Materiales

4.2.1 Laboratorio de biología molecular

EQUIPOS

1. Espectrofotómetro Genesys 10UV-VIS (N=1) (THERMO SCIENTIFIC)
2. Baño María Seco (N=2) (MEMMERT)
3. Software de análisis de fragmentos de ADN – FAMD
4. Termociclador Veriti 96 (APPLIED BIOSYSTEMS)
5. Fotodocumentador UV-STAR (BIOMETRA)

REACTIVOS

6. Kits de extracción de ADN genómico por columnas silica (N=2) (GF1 TISSUE DNA EXTRACTION KIT VIVANTIS-GENEON)
7. Fluorescent dye 1 mL (N=4) (GENEON)
8. Cebadores o primers específicos (N=10) (INVITROGEN)
9. PCR Master mix 2x (N=4) (THERMO SCIENTIFIC)

10. Gel agarosa 1% (GENEON)
11. Placas de PCR (N=2) (AXYGEN)
12. Cámara de electroforesis (CLAVER SCIENTIFIC)

4.3 Métodos

5.3.1 Cepas de salmonela

Un total 95 cepas fueron aislados de diferentes sistemas de producción avícola en Perú e identificados microbiológica y bioquímicamente como *Salmonella sp.* como parte de otro estudio de investigación. Estas cepas fueron liofilizadas mediante un equipo de liofilización (labconco) etiquetadas y almacenadas a 4⁰C¹² hasta su uso en el presente estudio.

5.3.2 Reactivación de cepas

Las cepas liofilizadas fueron primero reactivadas agregándole 2 ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y después sembradas en medios de cultivo específicos para salmonela: AGAR SALMONELLA–SHIGELLA (SS) y AGAR XILOSA-LISINA DESOXICOLATO (XLD), luego fueron colocadas las placas en incubadora por 24 horas a una temperatura constante de 37 ⁰C¹².

Por último se colectaron de las placas sembradas las colonias de salmonela y se las puso en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml con caldo BHI y fueron derivadas al área de biología molecular donde fueron inactivadas en buffer de lisis

5.3.3 Identificación molecular de serovar de *Salmonella entérica*.

Todos los procesos que se realizaron durante la preparación de las cepas de salmonela se produjeron en un ambiente especial de bioseguridad tipo II y en una cámara de flujo laminar de bioseguridad tipo II.

5.3.4 Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico de salmonela a partir de cultivo puro inactivado mediante la técnica de lisis celular con sales y proteinasa K seguida de adsorción en membranas de sílica utilizando el kit Vivantis GF-1

Tissue DNA EXTRACTION.(Vivantis), siguiendo las instrucciones del fabricante: (anexo 1).

5.4.2 Cuantificación y dilución de ADN

El ADN genómico extraído fue cuantificado por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm y fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % para determinar su integridad, finalmente fue almacenado a 20 grados centígrados. El ADN genómico fue diluido con Buffer TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA) hasta una concentración final de 5 ng/uL.

5.5 Identificación de serotipos de *Salmonella entérica* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se realizó la identificación molecular de *Salmonella entérica subesp. entérica* a partir de las 95 muestras diluidas de ADN obtenidos por medio de PCR de una secuencia cromosomal específica de salmonela.

Una vez comprobada la presencia del fragmento cromosomal específico del género salmonela se procedió a la identificación de las serovariedades de *Salmonella entérica* mediante amplificación específica de un fragmento del gen SefA, FliC y Random sequence mediante PCR multiple.³⁷

Un fragmento de 429 bp perteneciente al Random sequence específica de *Salmonella sp.* fue amplificada con los cebadores: ST11 (5'-GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA-3') y ST15 (5'-GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG-3'); un fragmente de 559 bp perteneciente al gen fli C de *Salmonella typhimurium* fue amplificado con los cebadores: Fli 15 (5'-CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT-3') y Tym (5'-ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT-3') y un fragmento de 312 bp perteneciente al gen sefA de *Salmonella enteritidis* fue amplificado con los cebadores: sef167 (5'-AGG TTCAGGCAGCGGTTACT-3'), sef478(5GGGACATTTAGCGTTTCTTG-3').

Se realizó la reacción de cadena de la polimerasa utilizando un volumen final de 20 uL conteniendo: 10 ng de ADN uL, 1X PCR buffer PCR, MgCl2 1.5 Mm, dNTPs 0.2 Mm, DNA Polimerasa 1 U, 5 pmol de cada cebador.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada utilizando los siguientes ciclos termales: 95 °C X 4' 35 ciclos 94 °C por 30 segundos 56 °C por 90 segundo 72°C por 30 segundos 1 ciclo de Extensión final de 72°C por 10 minutos. Y los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis para la cual se Cargó 3 uL de producto de PCR mezclado con

2 uL de Fluorescent DNA loading dye (GeneOn). Los tamaños de los productos de PCR fueron determinados mediante comparación con un marcador de peso molecular (100 bp plus blue DNA ladder - GeneOn) en un gel de agarosa al 1.2% TBE 1X. a 100 voltios durante 40 minutos.

5.5.1 Identificación molecular de *Salmonella infantis* mediante PCR

Se realizó la identificación molecular de *Salmonella entérica serovar infantis* a partir de las muestras que salieron positivos en el PCR a *Salmonella sp.* Fue amplificado un fragmento de 727 bp, utilizando los siguientes cebadores: S558F (5'-ACAACGACAGCTTATGCCG-3') y 1275R (5'-CCACCTGCGCCAACGCT-3').

Se realizó la reacción de cadena de la polimerasa utilizando un volumen final de 10 uL conteniendo: 10 ng de ADN uL, 1X PCR buffer PCR, MgCl₂ 1.5 Mm, dNTPs 0.2 Mm, DNA Polymerase 1 U, 5 pmol de cada cebador.

La PCR fue realizada utilizando los siguientes ciclos termales: 95 °C X 4' 35 ciclos 94 °C por 30 segundos 56 °C por 30 segundos 72°C por 60 segundos 1 ciclo de Extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis para la cual se cargó 3 uL de producto de PCR mezclado con 2 uL de Fluorescent DNA loading dye (GeneOn). Los tamaños de los productos de PCR fueron determinados mediante comparación con un marcador de peso molecular (100 bp plus blue DNA ladder - GeneOn) en un gel de agarosa al 1.2% TBE 1X. a 100 voltios durante 40 minutos.

5.5.2 Tipificación molecular de serovares de *Salmonella entérica subesp. entérica* mediante REP-PCR.

Se realizó la tipificación y trazabilidad molecular de los diferentes serovares de salmonela a partir de las muestras de ADN obtenido mediante una prueba de identificación de ADN fingerprinting (Huella genética) para cada cepa mediante la técnica de REP-PCR.

Fragmentos entre 500 y 1500 pares de bases fueron amplificados mediante REP-PCR utilizando los cebadores: REP 1(5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3') y REP 2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3')²⁹ y la reacción y condiciones de PCR se llevó a cabo similar a lo descrito por Albufera y col. (2009), reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 uL, Premi-mix (GeneOn, Thermo) 10 uL, cebadores REP1 2.5 uL y REP2 2.5 uL, H₂O PCR 3 uL y 2 uL de ADN genómico.

La PCR fue realizada utilizando los siguientes ciclos termales: 1 ciclo de desnaturalización inicial: 95°C por 3 minutos 30 ciclos: 90°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 52°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos y 1 ciclo de extensión final: 72°C por 8 minutos, la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cyclor (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris, Borato, EDTA) durante 45 minutos a 80 voltios.

5.6 Análisis de variabilidad genética de *Salmonella entérica subesp. entérica*.

Una huella dactilar genética (ADN fingerprinting) fue realizada a partir de los patrones de bandas generadas por la técnica de REP-PCR utilizando el programa BiodocAnalyze v2.2 (Biometra). Patrones de bandeo de fueron transformados a una matriz de (dis)similaridad utilizando el coeficiente de Jaccard y Dice) mediante el programa FAMD v1.25⁸⁰. Un análisis de la variabilidad genética intra e interespecifica para las 95 cepas de salmonela fue realizada utilizando AMOVA y dendogramas generados mediante el método UPGMA en base a una matriz de distancia genética mediante los programas FAMD v1.25 y Mega v5.0.⁸⁰

V. RESULTADOS

6.1 Estandarización de una técnica molecular basada en PCR de serotipificación.

La técnica de extracción de ADN genómico mediante columnas de sílica demostró una alta eficiencia y calidad para la obtención de ADN genómico de alto peso molecular. La cantidad de ADN promedio obtenido por el método fue de aproximadamente 40 ug, con valores promedio de relación de absorbancia a 260/280 de 1.9 y de la relación 260/230 de 1.8, considerándose ADN libre de proteínas, alcoholes y sales en exceso.

La integridad del ADN genómico fue aceptable, demostrando la obtención de ADN de alto peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 7)

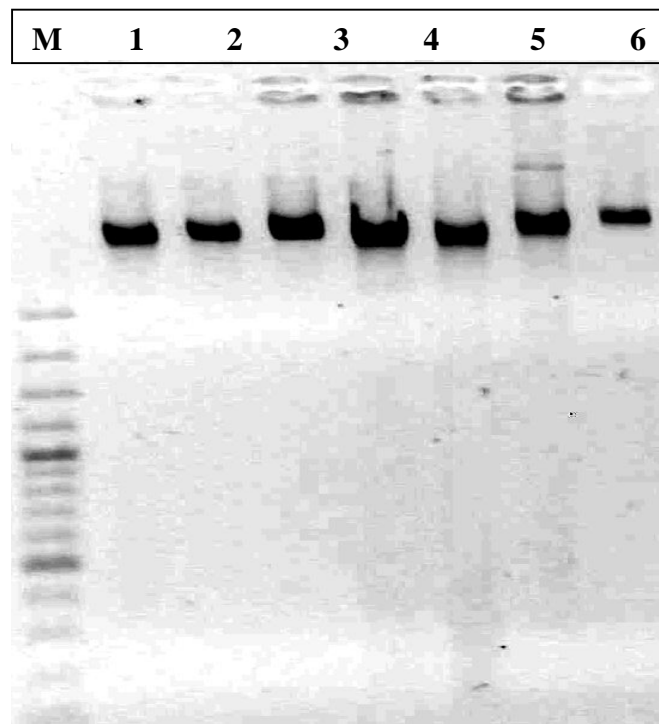


Figura 1. ADN genómico extraído de salmonela M, marcador de peso molecular 100 bp plus blue, Línea 1-7 muestras de salmonela.

La técnica de PCR múltiple para serotipificación de *Salmonella entérica* demostró ser robusta para la amplificación múltiple de los serovares *typhimurium* y *enteritidis* a partir de ADN genómico de *Salmonella entérica* (Figura 8). El serovar *enteritidis* mostraba la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 312 bp, el serovar *typhimurium* aproximadamente 559 bp y el control de amplificación (fragmento cromosomal de *Salmonella entérica*) aproximadamente 429 bp⁸². (anexo 2)

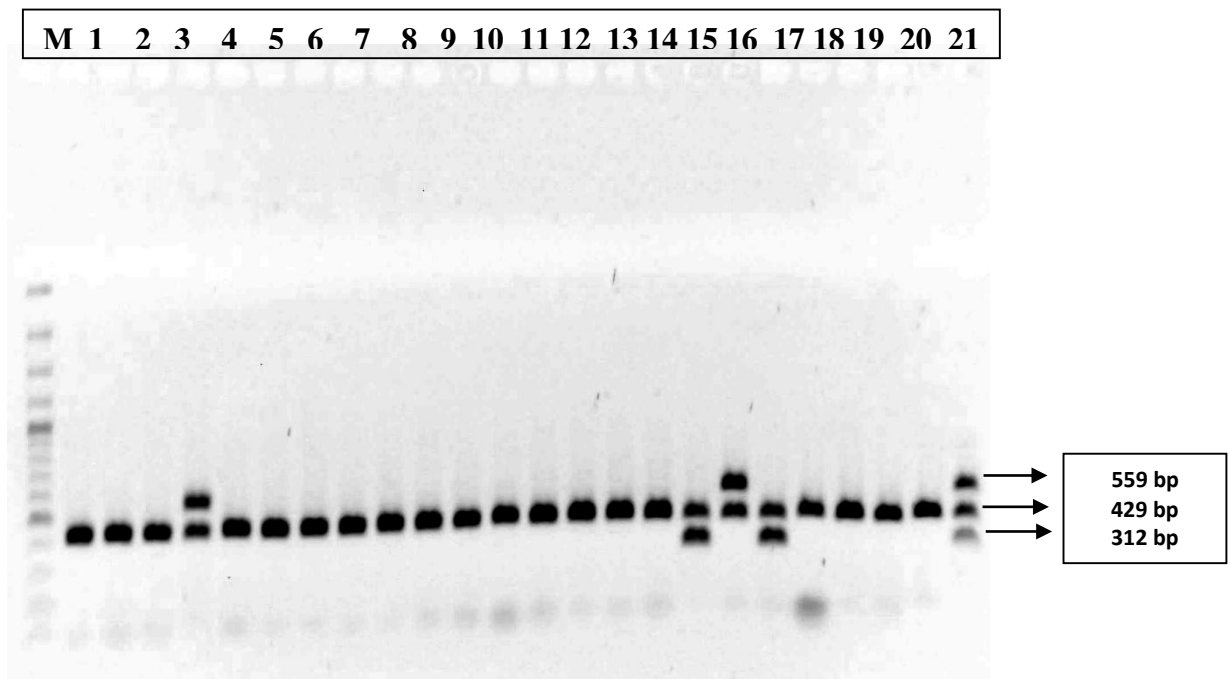


Figura 2. Identificación molecular serotipos de salmonela.

M, marcador de peso molecular 100 bp plus blue, Línea 1, *Salmonella sp*; Línea 2, *Salmonella sp*; Línea 3, *Salmonella sp*; Línea 4, *Salmonella typhimurium*; Línea 5, *Salmonella sp*; Línea 6, *Salmonella sp*; Línea 7, *Salmonella sp*; Línea 8, *Salmonella sp*; Línea 9, *Salmonella sp*; Línea 10, *Salmonella sp*; Línea 11, *Salmonella sp*; Línea 12, *Salmonella sp*; Línea 13, *Salmonella sp*; Línea 14, *Salmonella sp*; Línea 15, *Salmonella sp*; Línea 16, *Salmonella sp*; Línea 17, *Salmonella enteritidis*; Línea 18, *Salmonella typhimurium*; Línea 19, *Salmonella enteritidis*; Línea 20,

Salmonella sp; Línea 21, **Salmonella sp**; Línea 22, **Salmonella sp**; Línea 23, **Salmonella sp**, C, controles +.

La técnica de PCR para identificación del serovar *infantis* demostró ser robusta para la amplificación a partir de ADN genómico de *Salmonella entérica* (Figura 9). El serovar *infantis* mostró la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 727 bp.

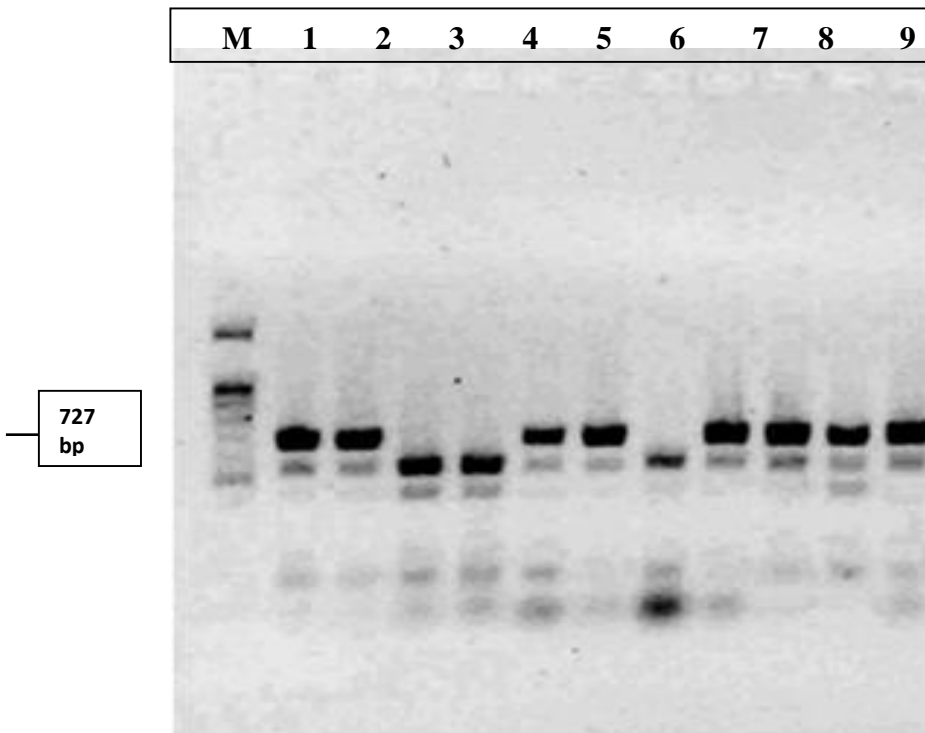


Figura 3. Identificación molecular de *Salmonella infantis*.

M, marcador de peso molecular 100 bp plus / 50 ng/ul, Línea 1, **Salmonella infantis**; Línea 2, **Salmonella infantis**; Línea 3, negativo; Línea 4, negativo; Línea 5, **Salmonella infantis**; Línea 6, **Salmonella infantis**; Línea 7, negativo; Línea 8, **Salmonella infantis**; Línea 9, **Salmonella infantis**; Línea 10, **Salmonella infantis**, C, control +

6.2 Identificación molecular de serotipos de *Salmonella entérica*.

De un total de 95 cepas aisladas de *Salmonella entérica*, 80 (84.21%) fueron serotipificadas molecularmente, con un total de 15 (15.79%) que no lograron ser serotipificadas a nivel de serogrupo. (anexo 5)

Del total de 95 cepas serotipificadas, 32 (33.68%) correspondieron al serotipo *enteritidis*, 15 (15.79%) al serotipo *typhimurium*, 48 (50.53%), *salmonella sp.* de las cuales fueron serotipo *infantis* 33 (34.74%). (Anexo 4 y 6).

Un total de 21 bandas polimórficas (loci) comprendidas entre 100 y 2000 pares de bases (media de 3.045 bandas por aislado) fueron observadas (Figura 10.) en un total de 80 aislados de *Salmonella entérica*. Un total de 1 locus privado fue encontrado en *Salmonella entérica* serovar *infantis* y serovar *typhimurium*, y un total de 7 loci privados fueron encontrados en *Salmonella entérica* serovar *enteritidis*. Se apreció una diferenciación clara entre los serovares (Φ ST = 0.6199) principalmente entre el serovar *infantis* con los serovares *enteritidis* (Φ ST = 0.6126) y entre serovar *typhimurium* (Φ ST = 0.7994) mientras que fue menor entre los serovares *enteritidis* y *typhimurium* (Φ ST = 0.4558), lo cual también fue apreciado por el análisis bayesiano.

La variación genética total medida por AMOVA ($V_t=0.3879$) fue explicada en un 61% por diferencias entre serovares ($V_a= 0.2405$) y un 38% por diferencias dentro de los serovares ($V_b=0.1474$).

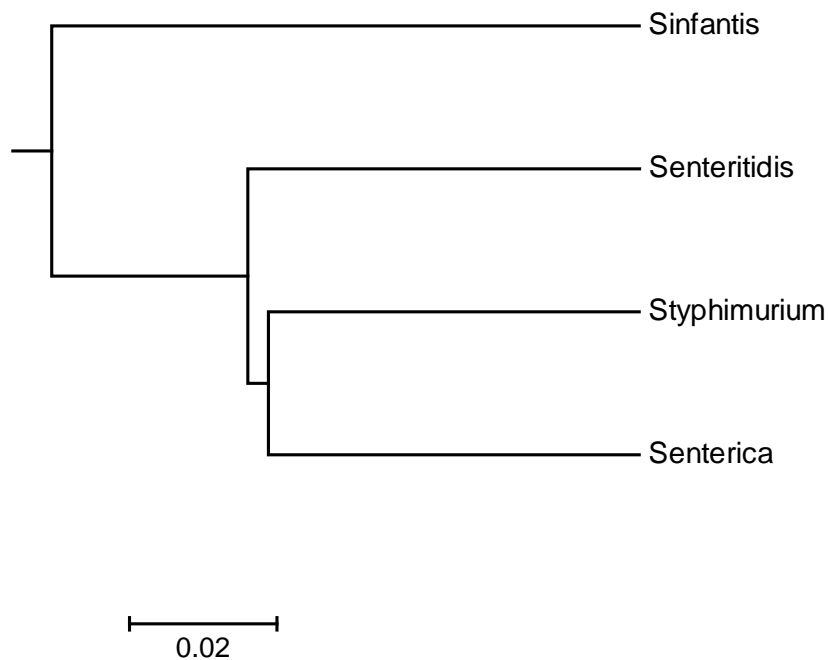


Figura 4. Dendrograma basado en distancia genética mediante método bayesiano para REP-PCR DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de 80 cepas de *Salmonella enterica*.

Las 95 cepas han sido agrupadas por serovar para visualizar las relaciones existentes entre diferentes serovares.

Un total de 13 bandas polimórficas (loci) comprendidas entre 100 y 2000 pares de bases (media de 3.59 bandas por aislado) fueron observadas (Figura 11) en un total de 32 aislados de *Salmonella entérica* serovar *enteritidis* a diferencia de lo observado en *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* con un total de 1 banda polimórfica (media de 1.6 bandas por aislado) y *Salmonella entérica* serovar *infantis* con un total de 5 bandas polimórficas (media de 1.94 bandas por aislado). Se apreció una moderada diferenciación entre los aislados de los tres serovares, los cuales se agruparon en al menos 2 clústeres genéticos, mostrándose mayor variabilidad en el serovar *infantis* (Figura 11, 12 y 13).

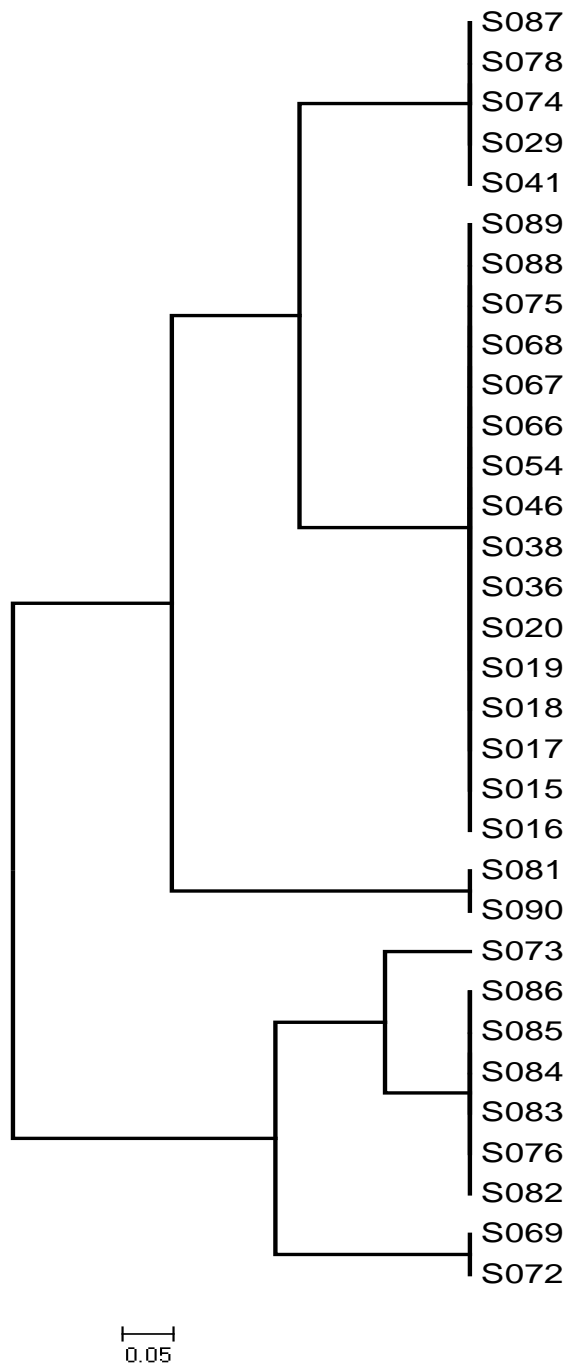


Figura 5. Dendograma basado una matriz de similaridad estándar mediante método de Neighbor Joining para REP-PCR DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de 32 cepas de *Salmonella enterica serovar enteritidis*.

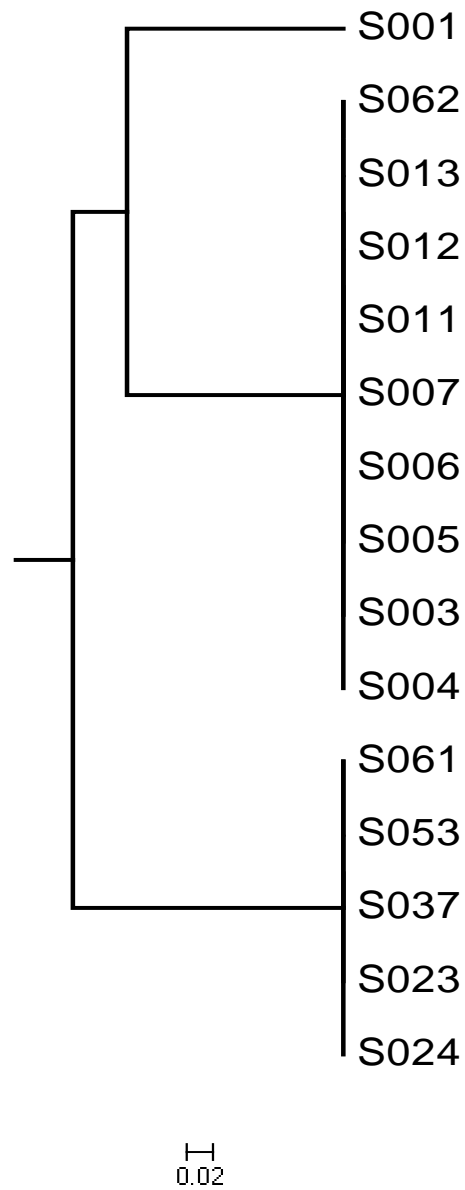
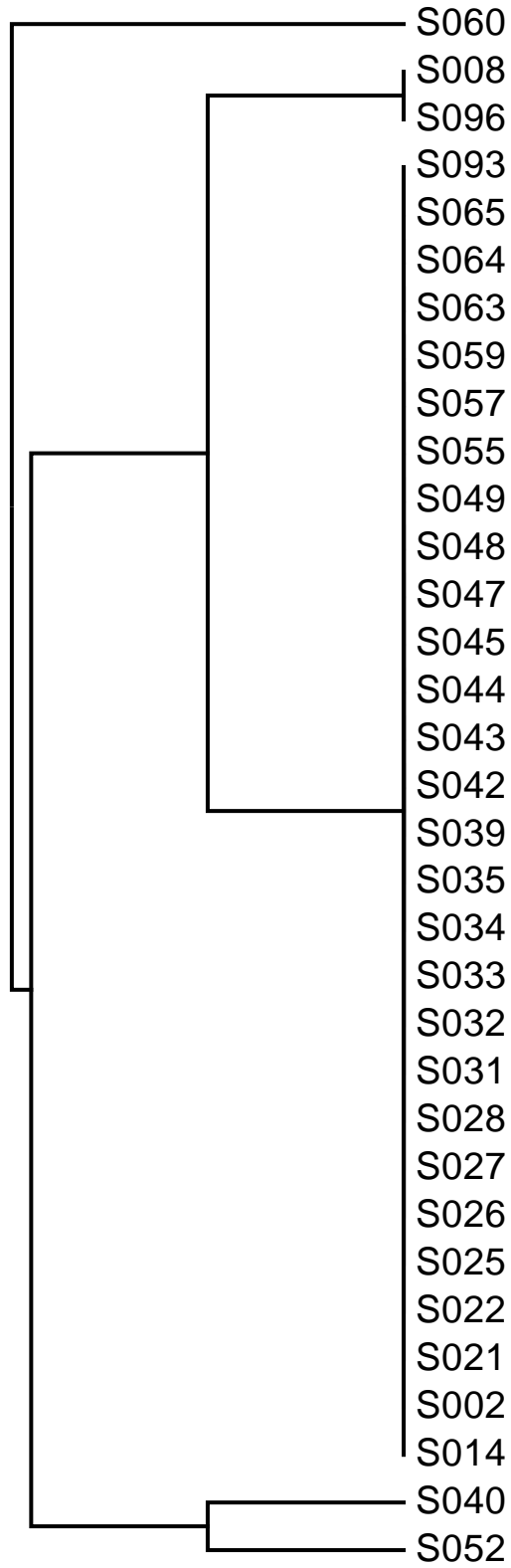


Figura 6. Dendrograma basado una matriz de similaridad estándar mediante método de Neighbor Joining para REP-PCR DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de 15 cepas de *Salmonella entérica serovar tiphymurium*.



0.05

Figura 7. Dendograma basado una matriz de similaridad estándar mediante método de Neighbor Joining para REP-PCR DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de 33 cepas de *Salmonella entérica serovar infantis*.

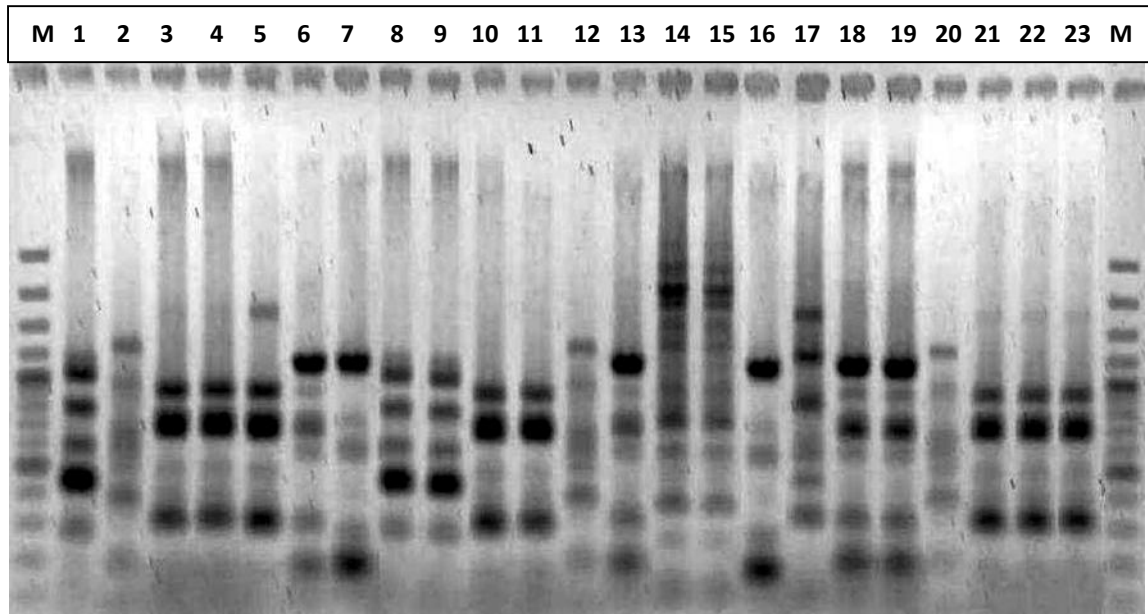


Figura 8. REP-PCR DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de cepas de *Salmonella entérica subesp. entérica*. **Líneas 1-23, Línea M marcador de peso molecular Generuler 100 bp plus DNA ladder (Fermentas)**. Gel de agarosa 1%, TBE 1X.

VI. DISCUSION

En un estudio de prevalencia de salmonela realizado por el SENASA en el Perú se han reportado, que en granjas avícolas es de 29.78% y las prevalencias por tipo de explotación del 48.71% en granjas de carne, 13.36% en granjas de postura comercial y 6.02% en granjas de reproductores. Los detectados con importancia además para salud pública fueron (*S. enteritidis* y *S. infantis*), siendo *S. infantis* el más frecuente estando en un 91% de las explotaciones ⁹¹⁻⁹².

El presente estudio reporta la presencia de los serovares *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. infantis* en sistemas de producción aviar en Perú acorde con lo previamente reportado por otros autores. Se puede observar la presencia y el aumento del serovar *S. infantis* en este estudio, que concuerda con otros estudios de prevalencia de la salmonela en granjas avícolas y tipo de explotación en nuestro país.⁹¹⁻⁹²⁻⁴⁹, a diferencia de los serovares, *S. gallinarum* y *S. pullorum* que no se detectaron. La ausencia de los serovares *gallinarum* y *pullorum* ⁹⁸ podría deberse al extenso plan de prevención y control de la tifosis aviar en granjas avícolas mediante vacunación.⁹¹⁻⁹²⁻⁹⁸

La disminución de la prevalencia de los serovares *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, podría ser explicada por el ingreso de nuevos objetivos para vacunas contra salmonela a partir del serovar *enteritidis* y *typhimurium* pero también, lo cual favorece el incremento de otros serovares no controlados como es el caso del serovar *infantis*, el cual ha venido incrementándose en número no solo en Perú sino en otras partes de Sudamérica.

Pero en general existen problemas en la industria avícola, como alimento contaminado, el inadecuado vacío sanitario que tiene los galpones, las distancias entre galpones, la sobrecarga del galpón, control sanitario del personal, la inadecuada reutilización de la cama, medidas de bioseguridad insuficientes y la utilización desmedida de antibióticos.

La utilización desmedida de antibióticos y muchas veces sin saber contra qué tipo de serovar de salmonela se aplica, ha llevado con el tiempo a la adaptación, mutación y resistencia de la bacteria y esto ha generado a su vez la desaparición de las cepas más débiles dentro de cada serovar permitiendo la permanencia de otras cada vez más resistentes y virulentas. La primera resistencia a los antimicrobianos en la salmonela se observó a principios de 1990 y se encuentra en muchos serotipos⁷². La emergencia de resistencia a múltiples fármacos en cepas de salmonela se ha asociado con el uso de antimicrobianos para diversos fines en animales destinados al consumo⁷²

Los programas de vacunación y el tipo de vacunas utilizadas en la industria avícola para salmonela, siendo estas de procedencia extranjera que contienen cepas básicas o generales contra las serovariedades *enteritidis* o *typhimurium*, además de estar combinadas para brindar protección contra otras enfermedades como por ejemplo: *Avibacterium paragallinarum* (coriza), cepa La Sota (virus de enfermedad de Newcastle), cepa Massachusetts del virus de (Bronquitis Infecciosa) y la cepa B8/78 (del virus de EDS).

Esto disminuye la protección que puede llegar a brindar la vacuna. Además de esto algunos criadores dentro de su programa de vacunación cuando se detecta la presencia de salmonela en granja revacunan con las mismas vacunas que contienen las mismas cepas de salmonela sin ampliar el espectro, además esto puede estar generando la adaptación, fortalecimiento y el circulamiento de cepas de las serovariaciones *enteritidis* y *typhimurium* encontradas.

La variabilidad genética en salmonela es una característica utilizada por esta bacteria como medio de adaptación y selección natural frente a mecanismos de control y prevención. Varios estudios han reportado un incremento en la variabilidad genética en serovares.⁴⁶

En un estudio encontraron que la variabilidad estaba presente en diversos aspectos del comportamiento de los aislados de *Salmonella entérica*, incluso dentro del mismo serotipo y más aún entre serotipos de diversas fuentes tales como; clínica, animal, medio ambiente, alimento, y otros.⁴⁶

Encontraron también una gran diversidad de variabilidad dentro de los serotipos; por ejemplo, en aislados de *S. typhimurium* que presentaban en

CRISPR-1 números que diferían en un máximo de 17 unidades y en CRISPR-2 una diferencia de 25 unidades. También se observaron altas relaciones filogenéticas en los serotipos del grupo CRISPR-1, caso contrario a lo que se observó entre los serotipos del grupo CRISPR-2⁴⁶.

Pero además, se encontró relación del 100% entre los serotipos *bury con indiana* en el grupo CRISPR-1. Mientras tanto, algunos serotipos tales como *hardar con typhimurium* e *infantis* con *weston* mostraron 100% de relación en el grupo CRISPR-2.⁴⁶

En el caso de *S. enteritidis* hay estudios y artículos, que describen similitud entre cepas recolectadas de casos esporádicos o brotes, y una que otra que no presenta tanto porcentaje de similitud, como se observa en un estudio realizado en Brasil de diversidad genética, virulencia y resistencia antimicrobiana de *S. enteritidis* durante 24 años, utilizando la técnica ERIC-PCR encontraron los siguientes porcentajes en 112 cepas entre SE 12 y SE 128 mostraron una similitud por encima de 85,4%, estas 112 cepas fueron aisladas entre 1986 y 2006, de heces humanas (57) y alimentos (55), que eran de brotes (74) y casos esporádicos (38) del grupo ERIC A¹⁹, el grupo ERIC B contenía ocho cepas entre SE 135 y SE 133 estas cepas se aislaron entre 1999 y 2001 también de heces humanas (3) y alimentos (5), a partir de brotes (6) y casos esporádicos (2), y mostraron una similitud por encima de 88,6%¹⁹, y el grupo ERIC C contenía ocho cepas, entre SE 253 y SE 273¹⁹ en el dendrograma exhibió 100% de similitud, estas cepas fueron aislados en 2009 y 2010 de heces humanas, menos uno de estas ocho cepas fueron aisladas de diferentes focos (7), la excepción SE 253, se aisló de una esporádica¹⁹.

Los resultados del presente estudio reportan una diferenciación clara entre los serovares *infantis* con los serovares *enteritidis* y serovar *typhimurium*, mientras que fue menor entre los serovares *enteritidis* y *typhimurium*, esto podría explicar que los procesos de control contra el serovar *enteritidis* podrían estar favoreciendo indirectamente el control del serovar *typhimurium*, pero más no el serovar *infantis*.

Se apreció una moderada diferenciación entre los aislados de los tres serovares, los cuales se agruparon en al menos 2 clústeres genéticos, mostrándose mayor variabilidad en el serovar *infantis*.

Las claras diferencias a nivel de variabilidad genética entre serovares puede deberse a la utilización de vacunas comerciales que en su mayoría contienen cepas de *S. enteritidis*, y no se vacuna contra *S. typhimurium* y menos *S.*

infanti, desde este punto ya hay diferencias y como se observa el serovar *infanti*. es el que difiere con los otros dos serovares.

Puede ser también que tenga que ver con serovares circulantes que se van manteniendo durante el tiempo en cada granja y tipo de explotación que se realiza.

Sin embargo, la variabilidad genética total fue explicada en menor grado por la diferenciación dentro de serovares, es decir poca variabilidad genética entre aislados de salmonela dentro de cada serovar. Esto es esperable al estar quedando las cepas más fuertes y resistentes, estas van sumando más características similares para mantenerse en el tiempo. En un trabajo realizado en hígados para consumo humano en mercados de México se encontraron también porcentajes de similitud del 86% y 100% entre cepas de *Salmonella typhimurium*⁸⁷.

Como se puede observar existen grados de similitud o igualdad entre cepas del mismo serotipo, pero también existen ciertos grados de variabilidad entre serotipos y entre cepas del mismo serotipo. Todo esto va depender de variaciones como del lugar del muestreo, si proviene de un brote o es esporádica, tipo de muestra (alimento, animal, heces, etc), además de las características propias que presenta cada serotipo de salmonela.

Este tema y resultado tiene importancia en salud pública y puede volverse un problema, ya que sabemos que esta bacteria es causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS).

VII. CONCLUSIONES

Existe poca variabilidad intraespecifica (dentro de cada serovar), pero existe más variación entre cada tipo de serovares.

Se detectó la presencia de las serovariedades *S. enteritidis* y *S. typhimurium* en sistemas de producción avícola de postura, carne y reproductoras, siendo el serovar *infantis* el más prevalente.

Se observó la diferenciación clara del serovar *infantis* de los serovares *enteritidis* y *typhimurium* (diferencia interespecifica).

La mayor variabilidad genética estuvo presente en las cepas de los serovares *enteritidis* e *infantis*.

VIII. RECOMENDACIONES

Deben realizarse más estudios al nivel molecular con técnicas y pruebas más avanzadas para realizar la tipificación, comparación, ver variabilidad, resistencia. Y observar durante el tiempo mutaciones o apariciones de nuevos serotipos o cepas de salmonela.

Los sistemas avícolas deben tener como aliado a los laboratorios de diagnóstico para tener registros y data de las granjas y tomar medidas correctas de prevención y control. Además los laboratorios de diagnóstico deben implementar pruebas complementarias que especifiquen los resultados con respecto a salmonela y sus serovares, una posibilidad son las pruebas moleculares.

Mejoramiento de los programas de vacunación en las granjas teniendo en cuenta en ampliar el espectro de serovares de salmonela para mayor y mejor protección.

Se deben tomar medidas, como muestreos, controles en las granjas y de productos avícolas, esto desde el área veterinaria que incluyan la parte de salud pública, frente a la aparición de *Salmonella infantis*.

Al existir un alto riesgo asociado a la producción de avícola y a la salud pública debe llevarse algún tipo de sistema de vigilancia sanitaria permanente para identificar en nivel de granjas infectadas y tomar medidas para reducir su prevalencia.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup FM, Hasman H, Olsen I, Sorensen G. International spread of bla(cmy-2)-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48: 1916–1917.
2. Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacteriosis y micosis. Organización Panamericana de la Salud. 2003; 3: 398.
3. Ahmed A M, Ishida Y, Shimamoto T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 106: 402–409.
4. Ahmed AM, Younis EE, Ishida Y, Shimamoto T. Genetic basis of multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from diarrheic calves in Egypt. *Acta Tropica*. 2009; 111: 144–149.
5. Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; 85: 9-15.
6. Arnold ME, estimation of salmonella prevalence in UK egg-laying holdings. Short communication. *Preventive veterinary medicine*. 2010; 94: 306 -309.
7. Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufeerally-Fakim Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009; 9: 322–327.
8. Alvarez J, Sota M, Vivanco A B, Perales I, Cisterna R, Rementeria A et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42 (4): 1734-1738.
9. Amavisit P, Markham PF, Lightfoot D, Whithear KG, Browning GF. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in an equine hospital. *Veterinary Microbiology*. 2001; 80: 85-98
10. Andrysiak A, Olson A, Tracz D, Dore K, Irwin R, Gilmour M et al. Genetic characterization of clinical and agri-food isolates of multi drug resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Canada. *BMC Microbiol*. 2008; 8-89.

11. Barrow PA, Huggins MB, Love II MA, Simpson JM. (1987). Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Research in Veterinary Science*. 1987; 42: 194–199.
12. Bioservice s.r.l. instructivo 133, reactivación de liofilizados. 2013.
13. Blanc-Potard A, Solomon F, Kayser J, & Groisman, EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*. 1999; 181, 998–1004.
14. Blau, D, McCluskey, B, Ladely, S, Dargatz, D, Fedorka, P, Ferris, K, et al. *Salmonella* in dairy operations in the United States: Prevalence and antimicrobial drug susceptibility. *Journal of Food Protection*. 2005; 68: 696–702.
15. Bolton D, Ivory C, McDowell D. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 160: 298-303.
16. Bonifaz V. Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Avances en Latinoamérica. BIOFARBO*. 2008; 16: 92-97.
17. Brenner, F, McWhorter-Murlin A. Identification and serotyping of *Salmonella*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 1998.
18. Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000: 38.
19. Campioni F, Moratto A, Falcão J. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology*. 2012; 32: 254-264.
20. Cejas D, Vignoli R, Quinteros M, Marino R, Callejo R, Betancor L et al. First detection of CMY-2 plasmid mediated β -lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. *Revista Argentina de Microbiología*. 2014; 46: 30-33.
21. [CCFH] Codex Committee on Food Hygiene. Food Safety Risk Profile for *Salmonella* species in broiler (young) chickens. *Codex Alimentarius. Risk Profile*. 2007: 30.
22. Chen J, Zhang L, Paoli GC, Shi C, Tu SI, Shi X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 137: 168-174.
23. Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist. Updat*. 2003; 6: 137–145.

24. Coll P, Coque M, Angeles M, Vázquez J, Vila J. métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. SEMIC. 2005.
25. Currie A, MacDougall L, Aramini J, Gaulin C, Ahmed R, Isaacs S. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for Salmonella Heidelberg infections in Canada. *Epidemiol Infect.* 2005; 133: 809-16.
26. Del Cerro A., Soto S., Mendoza M. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for Salmonella isolated from samples of animal origin. *Food Microbiology.* 2003; 20: 431–438.
27. Del Vecchio VG, Petroziello J, Gress MJ, McCleskey F, Melcher GP, Crouch HK, et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus via Fluorophore-Enhanced Repetitive-Sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:214-4 .
28. Dieye Y, Ameiss K, Mellata M, Curtiss R. The Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *BMC Microbiology.* 2009
29. Dombek, P. E., L. K. Johnson, S. T. Zimmerley, and M. J. Sadowsky. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate Escherichia coli isolates from human and non-human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology.* 2000 66:2572-2577.
30. Doran JL, Collinson SK, Clouthier SC, Cebula TA, Koch WH, Burian J et al. Diagnostic potential of sefA DNA probes to Salmonella enteritidis and certain other O serogroup D1 Salmonella serovars. *Mol. Cell. Probes.* 1996; 10: 233–246.
31. Ellingson J, Anderson J, Carlson S, Sharma V. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of Salmonella in raw and ready-to-eat meat products. *Molecular and Cellular Probes.* 2004; 18: 51-57
32. Enfermedades emergentes. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México.* 2005; 47: 388-390.
33. European food safety authority y European centre for disease prevention and control. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *ESFA journal.* 2014; 3547: 61-67.
34. [FAO, OMS] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Organización Mundial de la Salud. Documento de Debate sobre estrategias de gestión de riesgos de Salmonella spp. en aves de corral. Orlando, EE.UU. Comisión del Codex Alimentarius. 2003: 20.

35. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22: 94-98
36. Foley S, et al. Population Dynamics of salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. *Applied and environmental microbiology.* 2011; 77: 4273-4279.
37. Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex Real Time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. *Journal of clinical microbiology.* 2003; 5134-5146.
38. García - del Portillo F. Salmonella intracellular proliferation: where, when, and how?. *Microbes infect.* 2001; 3:1305-1311.
39. Gaviria C., Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos, Carrera de Bacteriología Colombia, PUJ. 1997.
40. Golab N, Khaki P, Noorbakhsh F. Molecular Typing of Salmonella Isolates in Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Iran. *Int J Enteric Pathog.* 2014; 2: 1-5.
41. Gräser Y, Clare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi H, et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2417-20.
42. Hanai K, Satake M, Naakanishi H, Venkateswaran K. 1997. Comparison of commercially available kits for detection of Salmonella strains in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 775-778.
43. Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. Real-time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods.* 2006; 66: 538-547
44. Hofer E, dos Reis E. Salmonella serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1994; 36.
45. Hoorfar J, Baggesen DL, Porting PH. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive Salmonella isolates. *Journal of Microbiological Methods.* 1999; 35: 77-87.
46. Huhu W, Yun J, Xuan L, Wenjuan Q, Xinglian X, Guanghong Z. Behavior variability of Salmonella enterica isolates from meat-related. *LWT - Food Science and Technology.* 2016; 73: 375-382

47. Hur J, Jawale CH, Hwa J. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animal. Food Research International, 2011; 45: 819-830.
48. [ICMSF] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods volumen 1. "Detección de Salmonella". University of Toronto. 1988: 2; 160-172.
49. Icochea E. Estatus de la salmonelosis en el Perú. Actualidad avipecuaria. 2010; 19: 22-26.
50. Jay J, Loessner M, Golden D. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza. Acribia. 2009: 5; 767.
51. Jean-Gilles J, Chorng-Ming Ch, Kai-Shun Ch, Ewing L, Wang H, Agpaoa M et al. The evaluation of a PCR-based method for identification of Salmonella enterica serotypes from environmental samples and various food matrices. Food Microbiology. 2010; 31: 199-209
52. Karasova D., Havlickova H., Sisak F. & Rychlik I. Deletion of sodCI and spvBC in Salmonella enterica serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection. Vet. Microbiol. 2009; 139:304-309.
53. Kingston DJ. A comparison of culturing drag swabs and litter for identification of infections with Salmonella spp. in commercial chickens flocks. Avian Dis. 1981; 25: 513-516.
54. Lasker B. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 2002; 40: 2886-92.
55. Liebana E, Garcia-Migura L, Breslin, Davies R, Woodward M. Diversity of Strains of Salmonella enterica Serotype Enteritidis from English Poultry Farms Assessed by Multiple Genetic Fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 154-161.
56. Liu B, Zhou X, Zhang L, Liu W, Dan X, Shi Ch, Shi X. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of Salmonella enterica Typhimurium and Enteritidis. Food Control. 2012; 27: 87-93.
57. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock, biología de los microorganismos. Pearson Alhambra. 2004; 10: 1096.
58. Matic I, Ekiert D, Radman M, Kohiyama M. Generation of DNAfree Escherichia coli cells by 2-aminopurine requires mismatch repair and nonmethylated DNA. J. Bacteriol. 2006; 188: 339-342.

59. Marrero-Ortiz R, Han J, Lynne A, David D, Stemper M, Farmer D, et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars isolated from dairy cattle in Wisconsin. *Food Research International*. 2012; 45: 962-967.
60. Maurischat S, Baumann B, Martin A, Malorny B. Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i: – by real-time multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2015; 193: 8-14.
61. Mezal E, Sabol A, Khan M, Ali N, Stefanova R, Khan A. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiology*. 2014; 38: 67-74.
62. Miller N, Davidson PM, D'Souza D. Real-time reverse-transcriptase PCR for *Salmonella* Typhimurium detection from lettuce and tomatoes. *LWT - Food Science and Technology*. 2011; 44: 1088-1097
63. Miller S, Pegues P. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*, *Principles of infectious diseases*. Churchill Livingstone.2000: 2344–2363
64. Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*. 2006; 23: 599-604.
65. OIE. SALMONELLOSIS. *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. 2008: 1-18.
66. Oliveira SD, Santos LR, Schuch DM, Silva AB, Salle CT, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*. 2001; 87: 25–35.
67. Olive DM, Bean P. *Principles and Applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms*. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1661-9.
68. Organización Mundial de la Salud. 1988. *Control de la salmonelosis: Importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal*. Ginebra: OMS. Series de Informes Técnicos 774. 95.
69. Organización Mundial de la Salud. 2002. *Evaluaciones de riesgos de Salmonella en huevos y pollos*. Ginebra: OMS. Resumen Interpretativo. 50.
70. Pascual A, Calderón, Pascual V. *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ediciones Díaz de Santos. 2000; 2: 441.
71. POPOFF M. *Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars*. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Pasteur Institute, Paris, France.2001.

72. Prasertsee T, Khantaprab N, Yamsakul P, Santiyanont P, Chokesajjawatee N, Patchanee P. *Asian Pac J Trop Dis.* 2016; 6: 390-395.
73. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias.* Acribia S.A. 2002; 1: 680.
74. Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. Non-typhoid salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection.* 2001; 3: 237-247.
75. Repetto M. *Toxicología avanzada.* Madrid: Díaz de Santos S.A. 1995: 621.
76. Reyes M, Geng M, Yarmas I. Investigación de *Salmonella* sp. en carnes de pollo crudo que se comercializan en tres mercados de la ciudad de Ica. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Perú. 2009.
77. Rojas-Herrera R, González-Flores T. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica.* 2006; 31: 69-76
78. Sadeyen JR, Trotereau J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow P, Bumstead N, Lalmanach A. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microb. Infect.* 2004; 1278-1286.
79. Samiullah, Chousalkar KK, Roberts JR, Sexton M, May D, Kiermeier A. Effects of egg shell quality and washing on *Salmonella* *Infantis* penetration. *International Journal of Food Microbiology.* 2013; 165: 77–83.
80. Schlüter M, Harris .Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 2006; 6: 569-572.
81. Soo Tein Ngoi, Cindy Shuan Ju Teh, Lay Ching Chai, Kwai Lin Thong, Overview of Molecular Typing Tools for The Characterization of *Salmonella enterica* in Malaysia. *Biomed Environ Sci.* 2015; 28: 751-764.
82. Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, et al. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 29:1-6.
83. Spratt B, Maiden Martin C. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *The Royal Society.* 1999; 354: 701-710.
84. Steele-Mortimer O, Brumell JH, Knodler LA, Meresse S, Lopez A, & Finlay BB.). The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2002.

85. Steve S, Pendrak L, Abela-Ridder B, Punderson J, Fedorko D, Foley S. An overview of Salmonella typing Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews.*2003; 4:189–204.

86. Suarez M, Mantilla J. Presencia de Salmonella serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *IATREIA.* 2000; 13: 237-245

87. Talavera M, Reyes N, Lagunas S, Fernández P, Morales V, Soriano E. Variabilidad genética de aislamientos de Salmonella typhimurium (grupo B) obtenidos de hígados de pollo destinados para consumo humano. *Rev Mex Cienc Pecu* 2011; 2 :371-380.

88. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 2731-9.

89. Uribe C, Suarez M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica.* 2006; 37: 151-158

90. Vadillo M, Píriz D, Mateos Y. Manual de microbiología veterinaria. McGraw – Hill. 2002, 853.

91. Valderrama W, Quevedo M, Pastor J, Mantilla Y, Ortiz M. Estudio de prevalencia de serotipos de salmonella en granjas avícolas tecnificadas en el Perú parte I. *MAP.* 2014; 7: 50-58

92. Valderrama W, Quevedo M, Pastor J, Mantilla Y, Ortiz M. Estudio de prevalencia de serotipos de salmonella en granjas avícolas tecnificadas en el Perú parte II. *MAP.* 2014; 7: 62-72.

93. Valdivia R, Falkow S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science*

94. Van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 547-560.

95. Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 174-8

96. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 :6823-6831.
97. Versalovic J, Schneider M, Brulin FJ, and Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 1994; 5:25-40.
98. Waltman D. Control de la salmonelosis aviar. *Actualidad avipecuaria.* 2014; 45: 56-62.
99. Wang L, Romana LK, Reeves PR. Molecular analysis of a *Salmonella enterica* group E1 rfb gene cluster: O antigen and the genetic basis of the major polymorphism. *Genetics.* 1992; 130.
100. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77: 7877-7885.
101. Welsh J, McClelland J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 7213-7218.
102. Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13: 5–18.
103. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Seventh Report on Surveillance of Foodborne Disease in Europe 1993–1998. Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary
104. WRAY C. & WRAY A., EDS. *Salmonella in Domestic Animals.* CAB International, Wallingford. 2000.
105. Yang SJ, Park KY, Seo KS, et al. Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* identified by multiplex PCR from animals. *J Vet Sci.* 2001; 2: 181-188.
106. Yanez E, Mattar S, Durango A. Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *ASOCIACION COLOMBIANA DE INFECTOLOGIA.* 2008; 12: 246-254
107. Yildirim Y, Gonulalan Z, Pamuk S, Ertas N. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Research International.* 2011; 44: 725-728.

108. Zambrano HF. Determinación de Salmonella spp. en centros de beneficio clandestino de aves de Lima Metropolitana. Tesis Título Profesional de Médico Veterinario. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS 2012: 1-57

109. Zegarra J, Palomino L, Ramos D, Manzanedo R, Angulo C, Alvarado A. Clasificación y priorización de los departamentos del Perú según variables epidemiológicas en sanidad avícola: I etapa. SENASA – Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM.2004.

X. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de Salmonela – kit comercial vivantis

1. Centrifugar tubitos (caldo BHI) muestra de colonias de salmonela a 14.000 rpm por 5 min.
2. Adicionar al tubito 200 µl de PBS y homogenizar.
3. Adicionar 20 µl de Proteinasa K y mezclar vigorosamente (Vortexear 20 segundos).
4. Adicionar 2 µl lysis Enhancer y homogenizar
5. Adicionar 200 µl de buffer TB y mezclar vigorosamente Y vortexear 20 seg.
6. Incubar por 15 minutos a 65 °C en baño maría
7. Adicionar 200 µl de etanol absoluto (99 %) y vortexear por 20 segundos.
8. Transferir el homogenizado a una columna DNeasy mini spin colocada sobre un tubo de colección de 2 ml (proveídos por el kit).
9. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
10. Descartar el tubo de colección con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de colección.
11. Adicionar 650 µl de wash buffer Centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto.
12. Descartar el tubo de colección con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
13. Incubar por 10 minutos a 65 °C en baño maría
14. Adicionar 200 µl de buffer EB a la columna y dejar incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
16. Almacenar el ADN genómico resuspendido a – 20 °C.
17. Opcionalmente. Se puede realizar una segunda dilución de la columna repitiendo los pasos 14 a 15.

Anexo 2. Tabla de resultados salmonellas serotipificadas.

ID SALMONELLA	GENERO ESPECIE	Y	Serotipo/ Serogrupo
S001	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S002	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>infanti</i>
S003	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S004	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S005	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S006	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S007	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S008	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>infanti</i>
S009	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>sp.</i>
S010	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>sp.</i>
S011	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S012	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>
S013	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>		<i>tiphymurium</i>

S014	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S015	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S016	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S017	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S018	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S019	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S020	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S021	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S022	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S023	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>tiphymurium</i>
S024	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>tiphymurium</i>
S025	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S026	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S027	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S028	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>

S029	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S030	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S031	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S032	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S033	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S034	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S035	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S036	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S037	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>tiphymurium</i>
S038	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S039	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S040	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S041	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S042	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S043	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>

S044	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S045	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S046	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S047	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S048	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S049	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S050	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S051	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S052	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S053	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>tiphymurium</i>
S054	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S055	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S056	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S057	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S058	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>

S059	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S060	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S061	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>tiphymurium</i>
S062	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>tiphymurium</i>
S063	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S064	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S065	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>
S066	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S067	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S068	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S069	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S071	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S072	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S073	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S074	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>

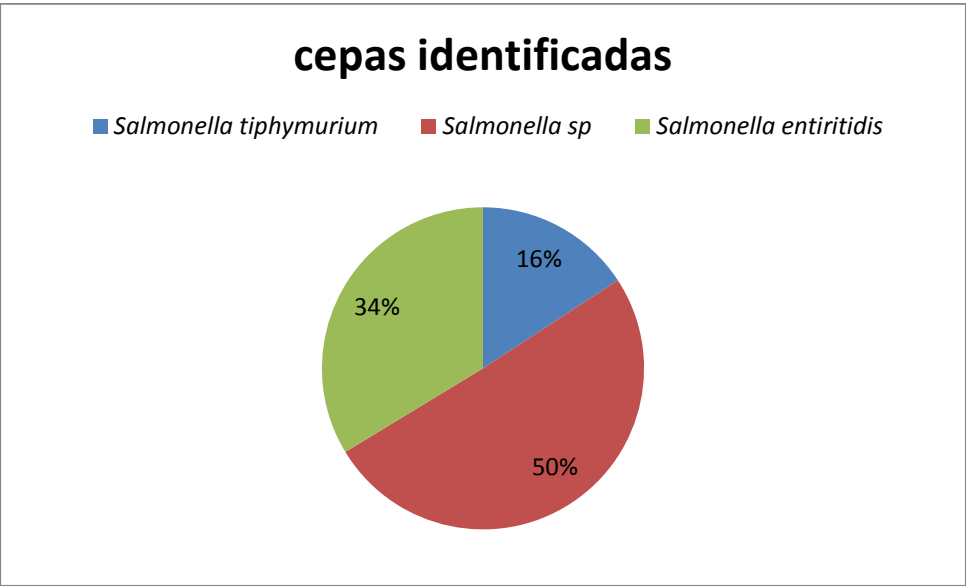
S075	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S076	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S077	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S078	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S079	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S080	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S081	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S082	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S083	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S084	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S085	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S086	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S087	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S088	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S089	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>

S090	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>enteritidis</i>
S091	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>Sp.</i>
S092	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S093	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>Infanti</i>
S094	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>Sp.</i>
S095	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>sp.</i>
S096	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar enterica</i>	<i>infanti</i>

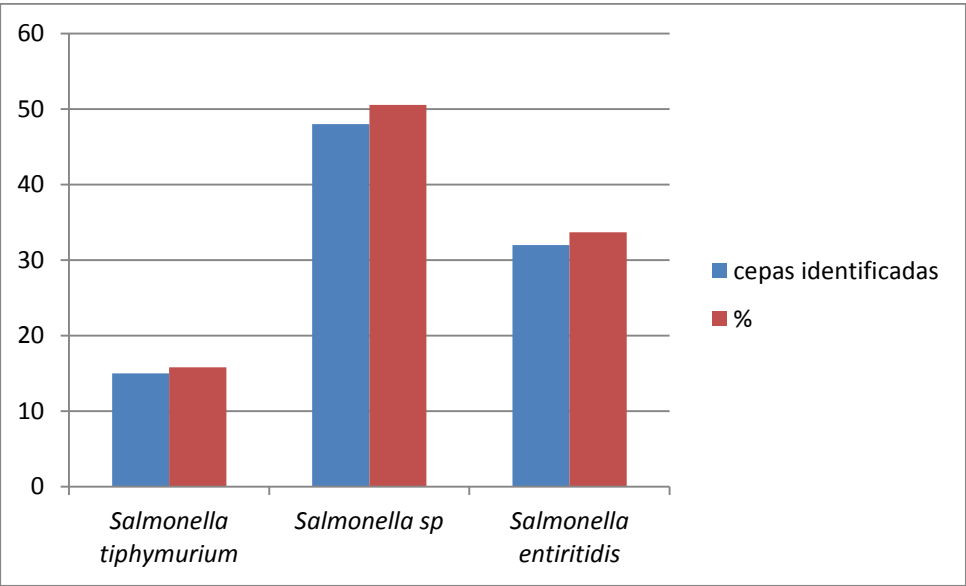
Anexo 3 Cepas serotipificadas

Serotipo	cepas serotipificadas	%
<i>Salmonella</i> <i>tiphymurium</i>	15	15.79%
<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	48	50.53%
<i>Salmonella</i> <i>entiritidis</i>	32	33.68%
Total muestras	95	100.00%

Tabla 02. Número y porcentajes de serotipos de salmonela identificados.



Grafica 01. Porcentaje de cada serotipos de salmonela identificados.

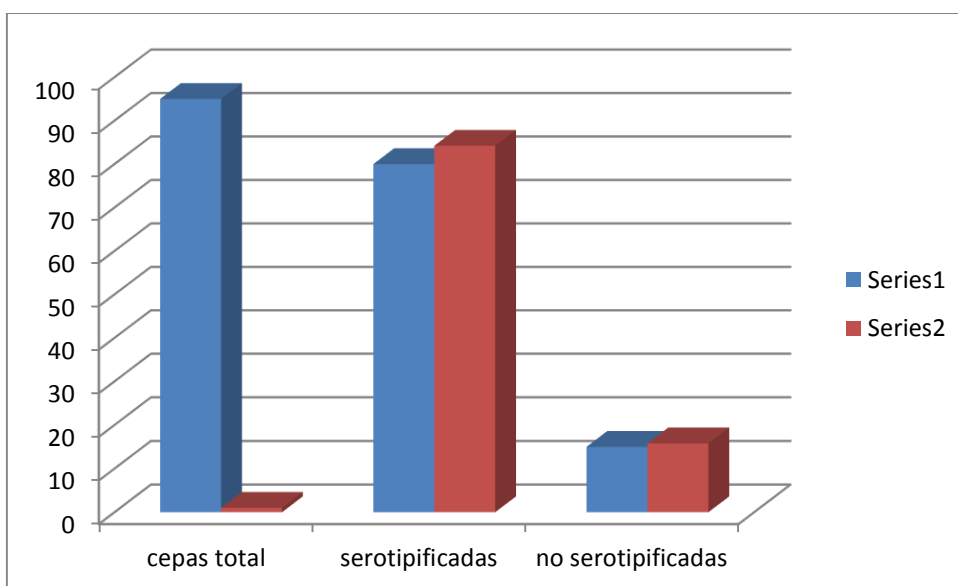


Grafica 02. Número y porcentajes de cepas aisladas.

Anexo 4. Muestras identificadas

cepas total	serotipificadas	No serotipificadas
95	80	15
100%	84.21%	15.79%

Tabla 03. Número y porcentajes de muestras que lograron ser identificadas.

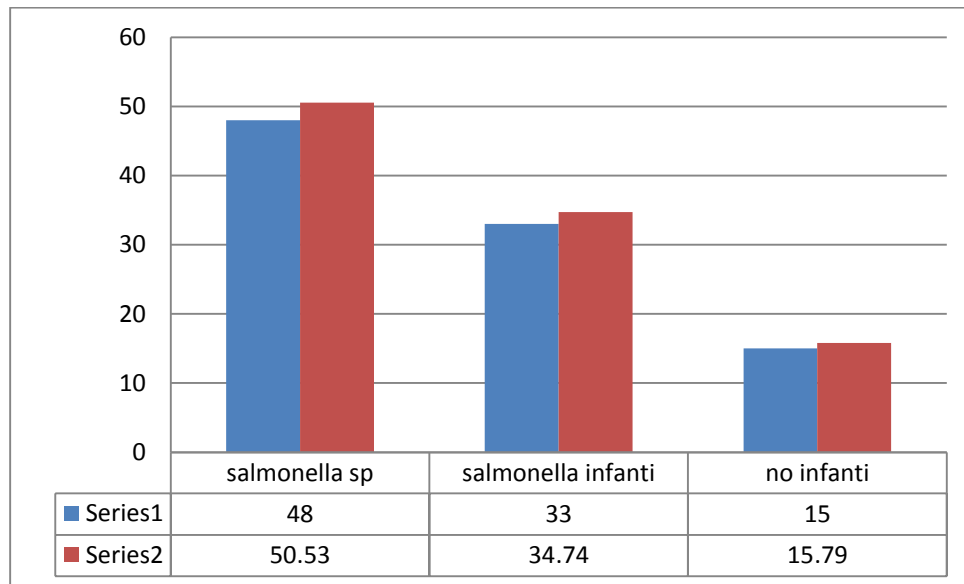


Grafica 03. Porcentaje de muestras identificadas

Anexo 5. Cepas de *Salmonella infantis*

Salmonella sp.	48	50.53%
salmonella infantis	33	34.74%
no infantis	15	15.79%

Tabla 04. Número y porcentajes de *Salmonella sp.* serotipificadas como *S. infantis*



Grafica 04. Representación en porcentaje del serotipo *infantis*