



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO y POSTÍTULO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE *Salmonella*
enterica AISLADAS DESDE PLANTELES PORCINOS**

JOAQUIM GASPAR RUBEM

Tesis para optar al Grado de
Magister en Ciencias Animales y Veterinarias

DIRECTOR DE TESIS: PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO – CHILE

2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

JOAQUIM RÚBEM GASPAR

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 27 DE MARZO DE 2018

DIRECTOR DE TESIS

DR. PATRICIO RETAMAL M.

.....

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DR. SERGIO BUCAREY V

DR. VÍCTOR NEIRA R.

.....

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a Universidad de Chile, especialmente a la dirección de la FAVET, a su conjunto de profesores y funcionarios administrativos por recibirme como estudiante de esta gran casa de conocimientos e investigación.

Quiero agradecer a mi profesor guía Dr. Patricio Retamal Merino por permitirme realizar mi tesis bajo su dirección en el laboratorio y en especial por su apoyo, ayuda, comprensión, atención, formación, dedicación, consejos, críticas, sugerencias y especialmente por ayudarme a orientar el trabajo con muchísima confianza.

A Dra Lisette Lapierre, Dr. Pedro Abalos, a todos los colegas de laboratorio y a los funcionarios del Dpto. de Medicina Preventiva, muchísimas gracias por vuestra ayuda y contribución para este estudio.

Quiero agradecer a mi padre, hermanos y familiares por estar siempre conmigo y apoyarme frente a todo. A mis compañeros y amigos tantos chilenos como angoleños, que me acompañaron durante todo el camino, dándome su apoyo, siempre se los recordaré con muchísimo cariño y consideración.

Quiero finalmente dedicar mi mayor agradecimiento a mi familia, especialmente a mi esposa, por apoyarme en esta formación desde el inicio.

Contenido

Resumen.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Serotipificación.....	10
2.2. Genes de virulencia.....	11
2.3. Resistencia a los antimicrobianos	12
2.4. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.	13
2.5. Reservorios	14
2.6. Cerdos como reservorios de <i>Salmonella</i>.....	14
2.7. La salmonelosis en Chile.....	15
Hipótesis:	17
Objetivo General:.....	17
Objetivo específico:.....	17
III. MATERIALES Y METODOS	18
3.1. Muestras.....	18
3.1.1. Aislamiento Bacteriológico.....	18
3.2. Objetivo específico 1: Tipificación Genotípica.....	18
3.3. Objetivo específico 2: Determinación de genes de virulencia	21
3.4. Objetivo específico 3: Determinación de genes de resistencia antimicrobiana.....	22
3.5. Objetivo específico 4: Diversidad de cepas en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana.....	25
IV. RESULTADOS	26
4.1. Tipificación genética.....	26
1.1. Determinación de genes y perfiles de resistencia antimicrobiana.....	31
4.4. Determinación de la diversidad de cepas en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana.....	33
5.1. Genotipificación.....	36
5.2. Perfiles de Virulencia	38
5.3. Resistencia Antimicrobiana.....	39
VI. CONCLUSIÓN	42
VII. BIBLIOGRAFIA	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Subespecies de <i>salmonella enterica</i> -----	10
tabla 2. Partidores utilizados en la tipificación genética de las cepas de <i>s. Enterica</i> -----	19
tabla 3. Composición de las reacciones de pcr múltiple-----	20
tabla 4. Condiciones de amplificación para las reacciones de pcr múltiple-----	20
tabla 5. Genes, su función y los respectivos partidores -----	21
tabla 6. Condiciones pcr -----	22
tabla 7. Mezcla de la reacción de pcr para la detección de genes de virulencia. -----	22
tabla 8. Genes asociados a resistencia antimicrobiana y características de los partidores a utilizar para su detección -----	23
tabla 9. Mix pcr convencional-----	24
tabla 10. Condiciones pcr -----	24
tabla 11. Perfiles de resistencia antimicrobiana-----	30
tabla 12. Combinaciones y perfiles de resistencia antimicrobiana -----	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dendograma de cepas de <i>s. Enterica</i> aisladas de distintos hospederos (fresno et al., 2013).....	27
Figura 2. Dendograma de cepas de <i>s. Enterica</i> aisladas desde cerdos..	29
Figura 3. Frecuencia relativa de los 20 genotipos identificados en las 46 cepas.....	30
Figura 4. Frecuencia relativa de los genes de virulencia en estas cepas de salmonella.	31
Figura 5. Frecuencia relativa de los genes de resistencia antibiótica en cepas de salmonella.....	32
Figura 6. Dendograma de cepas de <i>S. Enterica</i> aisladas desde cerdos en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana (virulotipos).....	34
Figura 7. Dendograma de cepas de <i>s. Enterica</i> aisladas desde cerdos en base a perfiles genéticos asociados a su origen planteles comerciales (PC1-5).....	35

Resumen

La enfermedad infecciosa causada por *Salmonella spp.*, se denomina salmonelosis, que es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos más comunes. El aislamiento e identificación de *Salmonella* se basa en el esquema de Kaufmann-White, y está compuesto por reacciones serológicas que usan anticuerpos contra las aglutininas de LPS, que se demora varios días para obtener los resultados. En este trabajo se ha implementado el método de genotipificación por PCR múltiple de 46 aislados de *S. enterica* aisladas de cerdos desde 5 planteles comerciales. Este método consiste en dos reacciones de cinco pares de partidores y una reacción de dos pares, basada en seis loci genéticos de *S. enterica* serovar Typhimurium y cuatro loci de *S. enterica* serovar Typhi. Como resultado, se determinaron 20 genotipos distintos que se relacionaron al origen de las cepas. Además se determinó la frecuencia relativa de los genes de virulencia *spvC* (54%); *pagK* (96%); *sirA* (96%); *gipA* (63%); *SEN1417* (37%); *prot6e* (0%) y *pefA* (80%) formando 12 perfiles genéticos y la frecuencia de genes asociados a resistencia antimicrobiana *tetA* (85%); *tetB* (7%); *tetG* (0%); *blaPSE-1* (0%); *blaTEM* (72%); *blaCMY* (0%); *aadB* (0%) y *aacC* (0%), constituyendo en total de 6 perfiles. Se construyó la matriz de datos para determinar la diversidad de estas cepas en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana, en donde se determinó 22 combinaciones o virulotipos distintos, los cuales se agruparon en 2 clústeres relacionados principalmente al origen de las muestras, confirmando así la hipótesis de circulación de múltiples cepas al interior de estos planteles, lo que representa una amenaza para el estatus sanitario de los animales y para la salud pública por su efecto en la inocuidad alimentaria.

Palabras claves: Genotipificación; *Salmonella enterica*; Virulotipos; Cerdos

Abstract

The infectious disease caused by *Salmonella spp.*, is called salmonellosis, which is a disease transmitted by the most common foods. The isolation and identification of *Salmonella* is based on the Kaufmann-White scheme, and is composed of serological reactions using antibodies against LPS agglutinins, which lasts several days to obtain the results. In this work, the PCR-based genotyping method has been implemented to analyze 46 *S. enterica* isolates from pigs belonging to 5 commercial establishments. This method consists of two reactions of five pairs of primers and a two-pair reaction, based on six genetic loci of *S. enterica* serovar Typhimurium and four loci of *S. enterica* serovar Typhi. As a result, 20 different genotypes were determined that maintained great closeness between them and their origin. In addition, the relative frequency of virulence genes was determined *spvC* (54%); *pagK* (96%); *sirA* (96%); *gipA* (63%); *SEN1417* (37%); *prot6e* (0%) and *pefA* (80%) forming 12 genetic profiles and the frequency of genes associated with antimicrobial resistance *tetA* (85%); *tetB* (7%); *tetG* (0%); *blaPSE-1* (0%); *blaTEM* (72%); *blaCMY* (0%); *aadB* (0%) and *aacC* (0%), constituting a total of 6 profiles. The data matrix was constructed to determine the diversity of these strains based on genetic profiles associated with virulence and antimicrobial resistance, where 22 different combinations or virulotypes were determined, which were grouped into 2 clusters related mainly to the origin of the samples. These results confirm the working hypothesis of circulation of multiple strains within these farms, which represents a threat to the sanitary status of animals and public health due to its effect on food safety.

Keywords: Genotyping; *Salmonella enterica*; Virulotypes; Pigs

I. INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, actuando como comensales y patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en sus hospederos, considerándose como la principal enterobacteria de importancia en salud pública (Cubillos, 2009).

La infección causada por estas bacterias recibe el término salmonelosis, enfermedad que se puede manifestar como dos procesos patológicos diferentes, la gastroenteritis y la fiebre tifoidea (Méndez *et al.*, 2011), constituyendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. (Tirado *et al.*, 2009). La gastroenteritis se transmite al ser humano a través de alimentos contaminados y es la forma clínica más importante. Se caracteriza por síntomas como dolor abdominal, malestar general, vómito, diarrea y en algunos casos fiebre, habiendo mayor mortalidad a los pacientes adultos inmunocomprometidos (Méndez *et al.*, 2011).

La fiebre entérica, más conocida como fiebre tifoidea, es el segundo proceso patológico que se caracteriza por ser un cuadro febril sistémico cuyos agentes etiológicos son *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, donde el ser humano se comporta como único hospedero (Méndez *et al.*, 2011), y sigue siendo un problema importante de salud pública, especialmente en los países en desarrollo en donde se reporta más de 20 millones de casos en cada año, lo que resulta en más de 400.000 muertes (Deng *et al.*, 2014).

La salmonelosis no tifoidea, es igualmente una enfermedad zoonótica de preocupación a nivel mundial, habiendo una gran variedad de animales actuando como reservorios del patógeno (Samiullah, 2013).

La contaminación microbiana de frutas y hortalizas frescas, agua de riego y suelo de cultivo, son consideradas las principales fuentes que ocasionan la pérdida de la inocuidad de alimentos, siendo la detección de coliformes fecales y *Escherichia coli*, la forma común y además autorizada para verificar la ausencia de contaminación de origen fecal, ya que un número elevado de estas bacterias indicadoras sugiere la presencia de patógenos específicos, como *Salmonella* o patotipos de *E. coli* (Lopez Cuevas *et al.*, 2009).

El factor principal en el éxito de *Salmonella* como un patógeno prácticamente universal es su capacidad de adaptarse a casi cualquier tipo de hospedero (IDEXX 2010) entre ellos, animales domésticos como aves de corral, porcinos, bovinos y animales silvestres (Fresno *et al.*, 2013).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La familia Enterobacteriaceae pertenece al orden Enterobacteriales (Cubillos, 2009) y está compuesta por los principales microorganismos implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos (Méndez *et al.*, 2011). Está conformada por 41 géneros y más de 100 especies, aunque menos de la mitad tienen interés desde el punto de vista veterinario (Cubillos, 2009).

En esta familia se encuentra el género *Salmonella*, caracterizado por ser bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo (Méndez *et al.*, 2011).

S. enterica está compuesta por 6 subespecies (Tabla 1), siendo la subespecie *enterica* la que se aísla con mayor frecuencia en el humano y los animales de sangre caliente (Gil-Setas *et al.*, 2002). Su principal sitio de infección es el tracto intestinal, y puede además formar parte de la flora normal de reptiles y anfibios. Dentro de la especie *S. enterica*, se han descrito más de 2500 serotipos, siendo algunas especie-específico, aunque la mayoría tiene un amplio rango de hospederos (Fresno & Retamal, 2011).

Los serotipos de *Salmonella* más frecuentes a nivel mundial son *S. enterica* serovar Enteritidis y *S. enterica* serovar Typhimurium (24,1% y 6,6% de los brotes atribuidos a estos serotipos respectivamente); ubicándose así como el principal microorganismo bacteriano implicado (46,9%) dentro del espectro de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), gracias a su extraordinaria capacidad de colonización y adaptación a diversos hospederos animales, donde las aves cumplen un papel protagónico (Méndez *et al.*, 2011).

Tabla 1. Subespecies de Salmonella enterica (Grimont & Weill, 2007)

I	<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i>
II	<i>S. enterica</i> subespecie <i>salamae</i>
IIIa	<i>S. enterica</i> subespecie <i>arizona</i>
IIIb	<i>S. enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i>
IV	<i>S. enterica</i> subespecie <i>houtenae</i>
VI	<i>S. enterica</i> subespecie <i>indica</i>

En conjunto, estos serotipos producen una gran variedad de infecciones, que van desde gastroenteritis auto limitantes, hasta enfermedades sistémicas severas (Fresno & Retamal, 2011).

La gastroenteritis por *Salmonella* es una zoonosis que se transmite por la ingestión de alimentos, agua o fómites contaminados por las heces de un animal o persona infectados y constituye una pandemia de distribución mundial, afectando a personas de cualquier edad, pero con mayor incidencia en lactantes y niños (Gil-Setas *et al.*, 2002).

Habitualmente la salmonelosis cursa como un proceso auto limitado, pero también existen casos graves que pueden requerir hospitalizaciones y en los que la instauración de un tratamiento antimicrobiano adecuado es primordial para la recuperación del paciente (Tirado *et al.*, 2009).

2.1. Serotipificación

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico que permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, siendo también de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión (Cubillos, 2009). El método tradicional de serotipificación se basa en el esquema de Kauffmann-White, que consiste en la caracterización, por aglutinación de los antígenos somáticos O, de los antígenos flagelares H y del antígeno capsular Vi, habiéndose descrito más de 2.500 serotipos (ISPCH, 2014).

Los serotipos pueden a su vez dividirse en los que se denominan fagotipos. La fagotipificación fue muy utilizada para la tipificación de *Salmonella* y consiste en estudiar la sensibilidad o resistencia de las cepas a una serie de virus bacteriófagos seleccionados, capaces de infectar y lisar las bacterias (De Toro, María Hernando Torres & Sáenz, 2013).

Actualmente existen técnicas de biología molecular mediante sondas de DNA capaces de identificar los serotipos más frecuentes de *Salmonella* que se pueden encontrar en aislados clínicos y de animales; sin embargo, la serotipificación con anticuerpos frente a los distintos antígenos es la técnica que se sigue utilizando habitualmente, aunque generalmente está restringida a centros de referencia (De Toro; María Hernando Torres & Sáenz, 2013).

La caracterización molecular es útil en muchos casos para diferenciar cepas bacterianas ya sea mediante electroforesis en agarosa convencional o electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Ambas presentan un enorme poder resolutivo para grandes moléculas de DNA, incluyendo fragmentos de genomas bacterianos (López, 2010).

En contraste, la genotipificación de *S. enterica* por PCR múltiple es un método bastante más simple y económico, que consiste en dos reacciones de cinco pares de partidores y una reacción de dos pares, basada en seis loci genéticos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y cuatro loci de *S. enterica* serovar Typhi (Beaubrun *et al.*, 2012). Este método permite discriminar aislados provenientes de distintos serotipos.

2.2. Genes de virulencia

Existen más de 2500 serovariedades de *S. enterica* conocidas, dentro de las cuales, puede haber distintas cepas que difieren en el grado de virulencia (CFSPH, 2006)

Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesaria la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su establecimiento, replicación y expresión de sus factores de virulencia. Dentro de los pasos que se presentan en el proceso infeccioso se pueden mencionar: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero (Ochoa & Rodríguez, 2005).

Los mecanismos moleculares de patogenicidad utilizados por *Salmonella* involucran una gran

cantidad de genes, generalmente agrupados en regiones denominadas islas genómicas que pueden contribuir directamente a la virulencia del patógeno u otorgar nuevas características que le permitan cursar un ciclo infeccioso exitoso (Valenzuela, 2009). Estos segmentos genéticos vinculados a funciones de virulencia, se conocen como islas de patogenicidad (SPI, de inglés *Salmonella* pathogenicity island).

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con más de 20 SPI, aunque cinco de ellas son compartidos por todos los serotipos de la especie. Varios genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación se encuentran en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Los genes localizados en las islas SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales. La isla SPI-4 codifica un sistema de secreción tipo I y se cree que participa en la adaptación en ambientes intracelulares. Finalmente la isla SPI-5 codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal. Debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia *Salmonella spp.* logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso (Ochoa & Rodríguez, 2005).

Los genes de virulencia asociados con la patogénesis de *Salmonella* están ampliamente distribuidos y su presencia en *Salmonella*, en particular los plásmidos, están implicados en infecciones graves y es un problema de salud pública (Wannaprasat *et al.*, 2011).

Estudios previos indican que la asociación de genes de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos en cepas clonalmente relacionadas plantea la conveniencia de vigilar su evolución y establecer los reservorios y las vías de propagación que podrían explicar su aparición en aislados clínicos (De Toro *et al.*, 2014).

2.3. Resistencia a los antimicrobianos

A nivel mundial existe un problema creciente de infecciones bacterianas de difícil tratamiento debido a la resistencia a los antibióticos, causada por el uso inadecuado y masivo de ellos, tanto en medicina humana como veterinaria (López, 2010).

En estudio previos, se ha determinado la transferencia *in vitro* de resistencia antibiótica entre miembros comensales y patogénicos del grupo Enterobacteriaceae en íleo de porcino, demostrando que el material genético que confiere resistencia es absolutamente transmisible entre cepas de *E. coli* y *Salmonella spp.* claramente, los miembros de este grupo de bacterias fueron capaces de intercambiar genes dentro de la micro flora intestinal de cerdo aumentando el riesgo de una posible falla en la terapia veterinaria (Vargas, 2008).

Algunos autores describen que la resistencia a los antimicrobianos considerados clásicamente de elección para el tratamiento se está incrementando. Además, la proporción de aislados de *Salmonella spp.* con susceptibilidad disminuida a fluoroquinolonas ha aumentado en muchos países (Tirado *et al.*, 2009). El alto porcentaje de *S. enterica* multiresistentes detectada en humanos, especialmente asociado a *S. enterica* serovar Typhimurium, dificulta la elección de alternativas seguras para el tratamiento empírico de infecciones graves ocasionadas por *Salmonella* y precisa estudios epidemiológicos continuos que permitan vigilar la evolución de la resistencia y la aparición de clones que aúnan resistencia y virulencia (De Toro *et al.*, 2014).

2. 4. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Los mecanismos principales de resistencia a los antimicrobianos son la destrucción e inactivación de la droga, modificación del sitio blanco, exclusión intrínseca y eflujo activo de la droga (Vargas, 2008). A nivel molecular, la resistencia es mediada por mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los integrones (Mosquito *et al.*, 2011).

Frente a las drogas, las bacterias han desarrollado sus propios mecanismos de defensa, como: presencia de enzimas específicas que modifican o inactivan el antibiótico, superproducción de la diana de acción del antibiótico, modificación de la diana celular o síntesis de una diana alternativa, expulsión del antibiótico al exterior celular mediante bombas de expulsión activa, alteración de la permeabilidad de membrana por pérdida de funcionalidad de porinas, lo que

restringe el acceso del antibiótico a la diana bacteriana (De Toro; María Hernando Torres & Sáenz, 2013).

2.5. Reservorios

Se han encontrado cepas de *Salmonella spp.*, en todas las especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios investigados, peces e invertebrados también pueden infectarse. Las infecciones prevalecen en las aves de corral, los porcinos y reptiles (CFSPH, 2006).

En cuanto a las aves comerciales, *S. enterica* serovar Enteritidis produce infecciones intestinales asintomáticas, aunque también se describen brotes agudos de enfermedad clínica y altos niveles de mortalidad en pollos menores de dos semanas. Los huevos son infectados por la vía transovárica y por contaminación externa de la cáscara (Fresno & Retamal, 2011).

2.6. Cerdos como reservorios de *Salmonella*

Los cerdos son muy susceptibles a la salmonelosis, la cual puede ser causada por un amplio número de serotipos, pero predominantemente por *S. Cholerae Suis* y *S. Typhimurium*, siendo *S. Cholerae Suis* altamente específica para los porcinos; sin embargo se ha podido aislar desde otros hospederos, incluyendo al ser humano (Castro, 1981).

En los cerdos, *Salmonella spp.* tiene como vía de infección la ingestión de alimentos contaminados, el contacto directo oro-fecal con portadores y agua contaminada, dando lugar así a la salmonelosis porcina (Hernandez et al., 2011). Estas cepas, pueden infectar desde los cerdos recién destetados hasta los mayores de 5 meses. *S. Cholera Suis* tiende a producir casos septicémicos y *S. Typhimurium*, casos entéricos (Cresa, 2008).

La transmisión de *Salmonella* a las personas se suele originar a través de la contaminación de la carne de cerdo por determinados serotipos; en un alto porcentaje de casos esta contaminación

ocurre en la línea de sacrificio o faenado donde el procesamiento de las canales constituye el principal factor de riesgo para que penetre en la cadena alimentaria, habiendo igualmente la posibilidad de infección cerdo-persona asociados al contacto directo con animales infectados en granjas o con canales contaminadas (Márquez, 2013).

2.7. La salmonelosis en Chile

La salmonelosis constituye un serio problema en el ámbito social, económico y de salud pública y se contrae generalmente por la vía fecal-oral en niños, contacto con animales infectados, incluidos los domésticos como perros y gatos y por el consumo de alimentos contaminados de origen animal crudos o insuficientemente cocidos, principalmente carnes, aves, huevos y leche (ISPCH, 2010).

Según reportes de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud, la *S. Typhi* representó hasta el año 1993 el serotipo identificado más frecuentemente por el ISP. Durante el año 1994 es remplazado por *S. enterica* serovar Enteritidis, cambio que se ha mantenido invariante. Durante el año 2010, *S. Enteritidis* acumuló un total de 1.769 casos, que corresponde a un 64,8% de todas las cepas de *Salmonella* aisladas desde personas. Este porcentaje es similar al reportado durante el año 1998, el cual, correspondió a un 69% del total de casos confirmados para este mismo serotipo (ISPCH, 2010). En el periodo de 2009-2014, según el informe del ISP, el 65,3% (10.584/16.214) de las cepas confirmadas correspondió a *S. Enteritidis*, el 12,7% (2.064/16.214) a *S. Typhimurium*, el 2,2% (364/16.214) a *S. Typhi* y el 2,0% (328/16.214) a *S. Paratyphi B* (ISPCH, 2014).

La expansión epidemiológica de *S. Enteritidis* en Chile (Fica *et al.*, 2001), es consecuencia del desarrollo que ha tenido la industria de los alimentos, y su persistencia en el mediano plazo asegurada por la ausencia de un programa efectivo de control y prevención.

En la actualidad, *S. Enteritidis* representa la causa mayoritaria de salmonelosis asociada a alimentos a nivel mundial y es el serovar de *Salmonella* aislado con mayor frecuencia en Chile (Silva, 2009). Estudios realizados en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET, sugieren que esta bacteria se encuentra ampliamente diseminada en la naturaleza, siendo

detectada en diversas especies de aves y mamíferos, tanto silvestres como en cautiverio en Chile (Fresno *et al.*, 2013). Algunas de estas cepas provenientes de distintos hospederos, incluyendo aislados de seres humanos, están filogenéticamente relacionadas (Toro *et al.*, 2016).

Hipótesis:

Aislados de *Salmonella enterica* desde cerdos de planteles comerciales de las Regiones de Valparaíso y O'Higgins de Chile, poseen diversos genotipos, perfiles de resistencia antimicrobiana y virulotipos, que sugieren la circulación de múltiples cepas al interior de este plantel.

Objetivo General:

Caracterizar genéticamente cepas de *Salmonella enterica* aislada de planteles porcinos de las Regiones de Valparaíso y O'Higgins de Chile

Objetivo específico:

- Tipificar genéticamente cepas de *S. enterica* aisladas desde planteles porcinos.
- Determinar la presencia de genes de virulencia en estas cepas
- Determinar la presencia de genes de resistencia antimicrobiana en estas cepas.
- Determinar la diversidad de cepas de *S. enterica* aisladas desde cerdos en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Muestras

3.1.1. Aislamiento Bacteriológico

En este estudio se analizaron un total de 46 cepas previamente aisladas, entre Enero y Marzo 2016, desde 150 muestras de linfonodos mesentéricos de cerdos obtenidos durante su faenamiento. Estos animales provinieron de 5 planteles porcinos de la misma empresa, 2 de ellos ubicados en la Región de Valparaíso y 3 en la Región de O'Higgins. Las cepas bacterianas se mantuvieron congeladas a -80°C en el sistema Microbank®, en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos.

También se analizaron cepas de *S. enterica* ser. Havana (SPP21 Y SPP49), Derby (SPP23), Infantis (SPP29), Heidelberg (SPP31; SPP40; SPP41 y SPP47), Agona (SPP33; SPP39a), Anatum (SPP48), Enteritidis (SPP50; SPP51 y SPP52) y Brandenburg (SPP84), previamente serotipificadas en el ISP y mantenidas en el cepario del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET.

Para su crecimiento, las cepas se cultivaron en medio BHI (triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 0,5%) y se incubaron a 37°C por 18-20 horas. Luego, se extrajeron el DNA de las cepas utilizando el método comercial de extracción por columnas GenJET Genomic DNA Purificación Kit® #K0721, #K0722 (Thermo Scientific), mediante el protocolo descrito por el fabricante.

3.2. Objetivo específico 1: Tipificación Genotípica

Se realizó un protocolo de PCR múltiple, que a través de la generación de patrones de bandas de secuencias amplificadas, es capaz de discriminar entre distintos serotipos de *S. enterica* (Beaubrun *et al.*, 2012). Una cepa representante de cada genotipo identificado fue posteriormente serotipificada según el esquema de Kauffmann-White en el ISP.

Para la genotipificación se utilizaron 12 blancos genéticos, que se amplificaron en 3 reacciones

de PCR múltiple, dos de ellas de cinco secuencias y una reacción de dos secuencias. Los partidores para cada una de las reacciones se describen en la tabla 2. La mezcla de la reacción y los parámetros de amplificación se describen en las tablas 3 y 4.

Tabla 2. Partidores utilizados en la tipificación genética de las cepas de *S. enterica* (Beaubrun *et al.*, 2012)

		Tamaño del producto (pb)	Patrón de amplificación
Reacción 1			
STM0716F	STM0716R	187	A
AACCGCTGCTTAATCCTGATGG	TGGCCCTGAGCCAGCTTTT		
STM1350F	STM1350R	171	B
TCAAAAATTACCGGGCGCA	TTTTAAGACTACATACGCGCATGAA		
STM0839F	STM0839R	137	C
TCCAGTATGAAAACAGGCAACGTGT	GCGACGCATTGTTTCGATTGAT		
STM4525F	STM4525R	114	D
TGGCGGCAGAAGCGATG	CTTCATTGACGCAACTGACGCTGAG		
STM4538F	STM4538R	93	E
TGGTCACCGCGCGTGAT	CGAACGCCAGGTTTCATTTGT		
Reacción 2			
STY0311	STY0312	301	F
TGGTATGGTTAAGCGGAGAATGG	GAGAGTCATAGCCCACACCAAAG		
STY0346	STY0347	262	G
GGCTGGAGCAGCCTTACAAAA	AAGAGTTGCCTGGCTGGTAAAA		
STY2299	STY2300	220	H
AATCCCCCCCCCTCAAAAA	GGTACACGTTTACTGTTTGCTGGA		
STM3845F	STM3845R	181	I
ATATCTCATCGTCTCCTTTTCGTGT	GAAGGTCCGGATAGGCATTCT		
STY2349F	STY2349R	124	J
AATTACGGAGCAGCAGATCGAGG	TGCGGCCAGCTGTTCAAAA		
Reacción 3			
PT4F	PT4R	225	K
GGCGATATATAAGTACGACCATCATGG	GCACGCGGCACAGTTAAAA		
STM2150F	STM2150R	101	L
CATAACCCGCCTCGACCTCAT	AGATGTCGTGAGAAGCGGTGG		

Tabla 3. Composición de las reacciones de PCR múltiple

Reacciones 1 y 2	μL	Reacción 3	μL
Buffer 10x	1,25	Buffer 10x	1,25
MgCl	0,34	MgCl	0,25
dNTPs	0,25	dNTPs	0,25
Mezcla de partidores	6,25	Mezcla de partidores	2,5
Taq pol	0,065	Taq pol	0,065
templado	0,5	Templado	0,5
H2O	3,845	H2O	7,685
Total	12,5	Total	12,5

Tabla 4. Condiciones de amplificación para las reacciones de PCR múltiple

Reacciones 1 y 2			Reacción 3		
T°	Tiempo	N° ciclos	T°	Tiempo	N° ciclos
94	5 min	1	94	5 min	1
94	30 seg	40	94	30 seg	40
60	30 seg		65	30 seg	
72	1 min		72	1 min	
72	5 min	1	72	5 min	1

3.3. Objetivo específico 2: Determinación de genes de virulencia

Los genes a detectar en el estudio tienen una presencia variable entre cepas de *S. enterica* (Huehn *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2009), los que se describen en la tabla 5. Las concentraciones y tiempos de incubación de la reacción de PCR para estos genes se describen en las tablas 6 y 7. Como controles positivos se utilizaron cepas de *S. Enteritidis* pertenecientes al cepario del laboratorio de Enfermedades Infecciosas, cuyos perfiles de genes de virulencia fueron previamente determinados (Fresno *et al.*, 2013). Como controles negativos se utilizaron mezclas de reacción sin templado. Posteriormente, se realizó electroforesis en gel agarosa al 2% y tinción con Bromuro de Etidio para la visualización de los amplificadores en el transiluminador UV “BioSens SC750”.

Tabla 5. Genes, su función y los respectivos partidores

Target	Function*	Primer	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Reference
<i>pefA</i>	V	D	cctgtgacctgaccacttctg	418	Huehn <i>et al.</i> , 2010
		R	gtaagccactgcgaaagatg		
<i>spvC</i>	V	D	ctccttgacacaaccaaagtcg	570	Huehn <i>et al.</i> , 2010
		R	tgctctgcatttcaccaccatc		
<i>sirA</i>	V	D	tgcgctggtgacaaaactg	313	Huehn <i>et al.</i> , 2010
		R	actgacttcccaggctacagca		
<i>gipA</i>	V	D	acgactgagcaggctgag	518	Huehn <i>et al.</i> , 2010
		R	ttggaaatggtgacggtagac		
<i>SEN1417</i>	V	D	gatcgctggctggtc	670	Pan <i>et al.</i> , 2009
		R	ctgaccgtaatggcga		
<i>prot6e</i>	V	D	gcctaaggttagtgtgactctc	579	Huehn <i>et al.</i> , 2010
		R	ctagcagccgttggtatcc		
<i>pagK</i>	V	D	accatcttcactatattctgctc	151	Huehn <i>et al.</i> , 2009
		R	acctctacacattttaaaccaatc		
<i>STY3676</i>	V	D	acctgagcacatcaagtct	347	Litrup <i>et al.</i> , 2010
		R	aaacaggttttcagggttct		

Tabla 6. Condiciones PCR

T° (°C)	Tiempo	N° ciclos
94	5 min	1
94	40 seg	35
60	40 seg	
72	60 seg	
72	10 min	1

Tabla 7. Mezcla de la reacción de PCR para la detección de genes de virulencia.

Reacciones 1 y 2	μL	Reacción 3	μL
Buffer 10x	1,25	Buffer 10x	1,25
MgCl	0,34	MgCl	0,25
dNTPs	0,25	dNTPs	0,25
Mezcla de partidores	3,75	Mezcla de partidores	2,5
Taq pol	0,065	Taq pol	0,065
Templado	0,5	templado	0,5
H2O	3,845	H2O	7,685
Total	12,5	Total	12,5

3. 4. Objetivo específico 3: Determinación de genes de resistencia antimicrobiana

Se seleccionaron genes que codifican resistencia a tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*), amoxicilina + ácido clavulánico y ampicilina (*bla_{PSE-I}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CMY}*), ceftiofur (*bla_{CMY}*), gentamicina (*aadB* y *aacC*). Como controles positivos se utilizaron cepas de *S. Enteritidis* que contienen estas secuencias, según se determinó mediante secuenciamiento de sus genomas completos (Toro *et al.*, 2016). Como controles negativos se utilizaron mezclas de reacción sin templado. Los genes evaluados en este estudio y sus respectivos partidores se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Genes asociados a resistencia antimicrobiana y características de los partidores

Gen	PCR	Secuencia 5´-3´	Producto (pb)	Tm (°C)	Resistencia*	Referencia
<i>tet(A)</i>	D	Gctacatcctgcttccttc	210	56.2	TET	(Ng <i>et al.</i> , 1999)
	R	catagatcgccgtgaagagg		55.1		
<i>tet(B)</i>	D	ttggttagggcaagtttg	659	53.5	TET	(Ng <i>et al.</i> , 1999)
	R	gtaatggccaataacaccg		53.9		
<i>tet(G)</i>	D	gctcgggtgatctctgctc	468	57.3	TET	(Ng <i>et al.</i> , 1999)
	R	agcaacagaatcgggaacac		55.5		
<i>bla_{PSE-1}</i>	D	tttggtccgcgctatctg	131	55.5	AMC/AMP	(Carlson <i>et al.</i> , 1999)
	R	tactccgagcaccaaatccg		57.0		
<i>bla_{TEM}</i>	D	gcacgagtgggttacatcga	290	57.2	AMC/AMP	(Carlson <i>et al.</i> , 1999)
	R	ggtcctccgatcgtgtcag		57.5		
<i>bla_{CMY}</i>	D	gacagcctctctttctccaca	1000	56.4	AMC/AMP	(Randall <i>et al.</i> , 2004)
	R	tggaacgaaggctacgta		52.9		
<i>aadB</i>	D	gagcgaatctgccgctctgg	319	60.8	CN	(Randall <i>et al.</i> , 2004)
	R	ctgttacaacggactggccgc		61.0		
<i>aacC</i>	D	ggcgcgatcaacgaatttatccga	489	59.7	CN	(Lynne <i>et al.</i> , 2008)
	R	ccattcgatgccgaaggaaacgat		59.7		

* TET Tetraciclina, AMC Amoxicilina + Ácido Clavulánico, AMP Ampicilina, EFT Ceftiofur, CN Gentamicina.

Para la detección de los genes asociados con resistencia antimicrobiana se realizó un PCR convencional, según las condiciones de amplificación indicadas en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Mescla PCR convencional

Reacciones 1 y 2	μL	Reacción 3	μL
Buffer 10x	1,25	Buffer 10x	1,25
MgCl	0,34	MgCl	0,25
dNTPs	0,25	dNTPs	0,25
Mezcla de partidores	3,75	Mezcla de partidores	2,5
Taq pol	0,065	Taq pol	0,065
templado	0,5	templado	0,5
H2O	3,845	H2O	7,685
Total	12,5	Total	12,5

Tabla 10. Condiciones PCR

T° (°C)	Tiempo	N° ciclos
94	5 min	1
94	30 seg	
55	30 seg	35
72	50 seg	
72	7 min	1

Posteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con Bromuro de Etidio para la visualización de los amplificadores en el transiluminador UV “BioSens SC750”.

3.5. Objetivo específico 4: Diversidad de cepas en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana

Se analizó la diversidad de estas cepas, por la construcción de una matriz de registro de datos con 46 filas (aislados) y 15 columnas (variables). Cada rasgo genético asociado a virulencia y a resistencia antimicrobiana fue considerado una variable categórica, donde la presencia del gen fue registrada con el número uno y su ausencia en cero.

Las similitudes o diferencias entre los perfiles genéticos se determinó mediante un análisis de conglomerados del tipo jerárquico, utilizando el método de agrupamiento de encadenamiento promedio (UPGMA) y el cálculo de la distancia de Jaccard del programa estadístico Infostat®.

La presencia de asociación entre los perfiles de genes de resistencia antimicrobiana y de virulencia con respecto a los genotipos se determinó utilizando el estadístico de X^2 para datos categorizados, mediante el uso de tablas de contingencia en el programa Infostat®.

3.6. BIOSEGURIDAD

S. enterica está clasificada como un agente de riesgo intermedio de acuerdo al Manual de Medidas de Bioseguridad CONICYT. Las medidas de contención corresponden a un nivel de aislamiento tipo II, y por este motivo se consideraron los siguientes aspectos de bioseguridad en el proyecto:

- Transporte, manejo de las muestras y desarrollo de los análisis haciendo énfasis en los estándares de bioseguridad descritos por los organismos de referencia nacional (SAG, ISP) e internacional (OIE; OMS).

- Los protocolos se realizaron en Cabina de Bioseguridad Nivel IIA
- Hubo acceso restringido a las áreas de laboratorio, señalización de peligro, desinfectante, contenedores especiales para almacenamiento del material contaminado, los cuales fueron aptos para uso en autoclave.
- En todos los laboratorios participantes, los residuos químicos peligrosos fueron almacenados en contenedores especiales hasta que una compañía especializada los neutralizó y los eliminó.

IV. RESULTADOS

4.1. Tipificación genética

La primera actividad realizada fue la tipificación genética de cepas de *S. enterica* almacenadas en el cepario del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET y serotipificadas según el esquema de Kauffmann-White en el ISP (Figura 1). Esta genotipificación generó un patrón típico de bandas mediante el ensayo de PCR-múltiple (Beaubrun *et al.*, 2012). Se representa la ausencia o presencia de genes específicos (Patrón de amplificación) mediante un código de letras desde la A hasta la L (**Figura 1 y 2**).

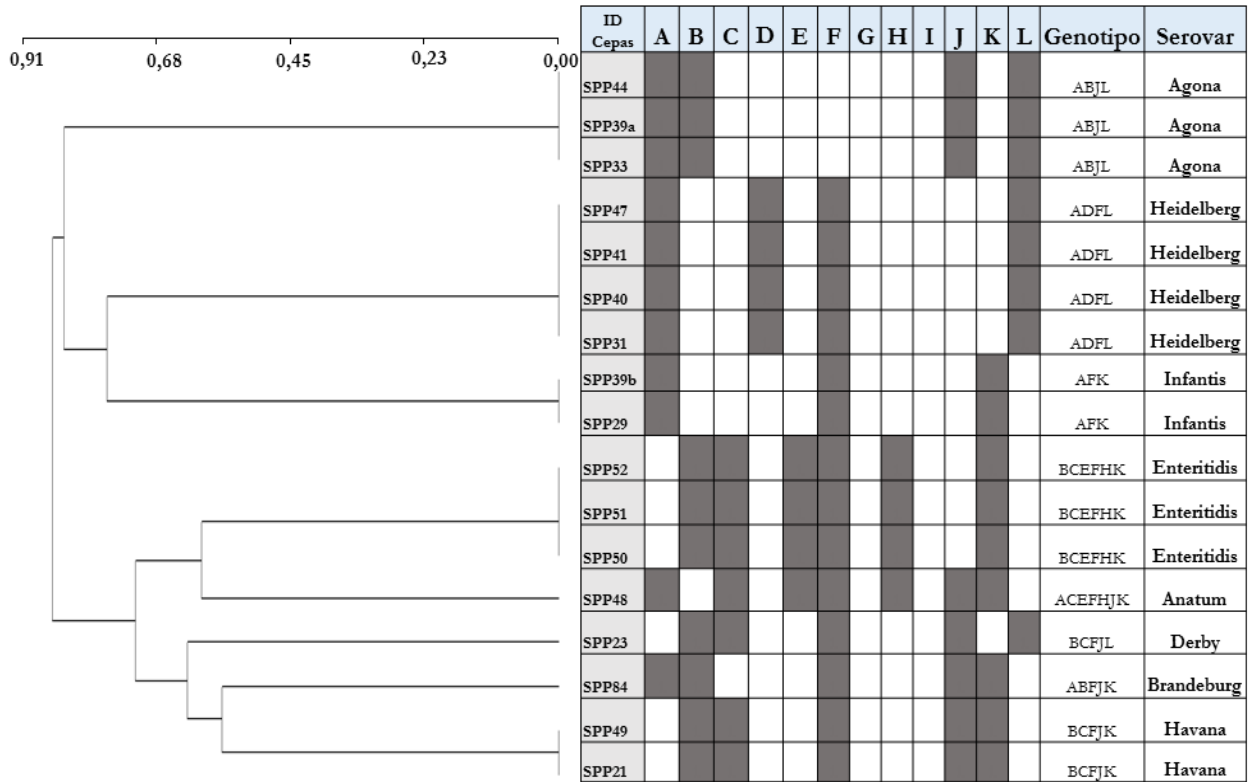


Figura 1. Dendrograma de cepas de *S. enterica* aisladas de distintos hospederos (Fresno et al., 2013) serotipificadas en el ISPCH y genotipificadas previamente. En cuadros negros se indica la presencia del gen específico (Patrón de amplificación). Mediante el código de letras (A hasta la L) se denota el genotipo. El dendrograma se obtuvo utilizando el método de agrupamiento de encadenamiento promedio (UPGMA) y el cálculo de la distancia de Jaccard mediante el programa estadístico Infostat®.

Luego, se tipificaron las cepas aisladas desde los planteles porcinos, las que se pudieron agrupar en 20 genotipos (**Figuras 2**), cuyas frecuencias relativas se observan en la **Figuras 3** ($p > 0,05$). Los resultados de la serotipificación en el ISP por el esquema de Kauffman-White, demostraron que, aunque se hayan obtenido varios genotipos en cada uno de los planteles de acuerdo al método de PCR Múltiple, cada plantel comercial (PC) estuvo asociado principalmente a un solo serotipo:

1. *Salmonella* Infantis en el PC1 que presentó 5 genotipos: G1(ABGL); G2(ABF); G8(ABHI); G9(BI) y G12(BCDGL);

2. *Salmonella* Typhimurium en el PC3 que presentó 9 genotipos: G10(CDJL); G13(ACDHIL); G14(BCHIL); G15(ABCDHIL); G16(BCDHIL); G17(ACDHIL); G18(CDHIL); G19(BCDIL) y G20(CDIL);
3. *Salmonella* Derby en el PC4, que presentó 4 genotipos: G3(ABCJL); G5(ABCEJL); G6(ABCEJ) y G7(ACJ);
4. *Salmonella* Typhimurium en el PC5 con 2 genotipos: G4(BCEJL) y G15(ABCDHIL), con la excepción de las cepas *Salmonella* Grupo B (1, 4,12:-) presentes en los planteles 1: G11(BCDGL) y 4: G6(ABCEJ) y G7(ACJ), cada una de ellas muy cercanas a los serotipos de los respectivos planteles.

Determinación de genes y perfiles de virulencia en estas cepas

La presencia de los genes de virulencia fue variable en los distintos genotipos, identificándose 12 combinaciones o perfiles genéticos (**Tabla 11**), con una distribución variable entre genotipos ($p < 0.01$). En el análisis individual de los genes, sus frecuencias fluctuaron entre 0 y 96% (**Figura 4**), y solo se determinó asociación significativa con serotipos a la secuencia *spvC* ($p \leq 0,05$).

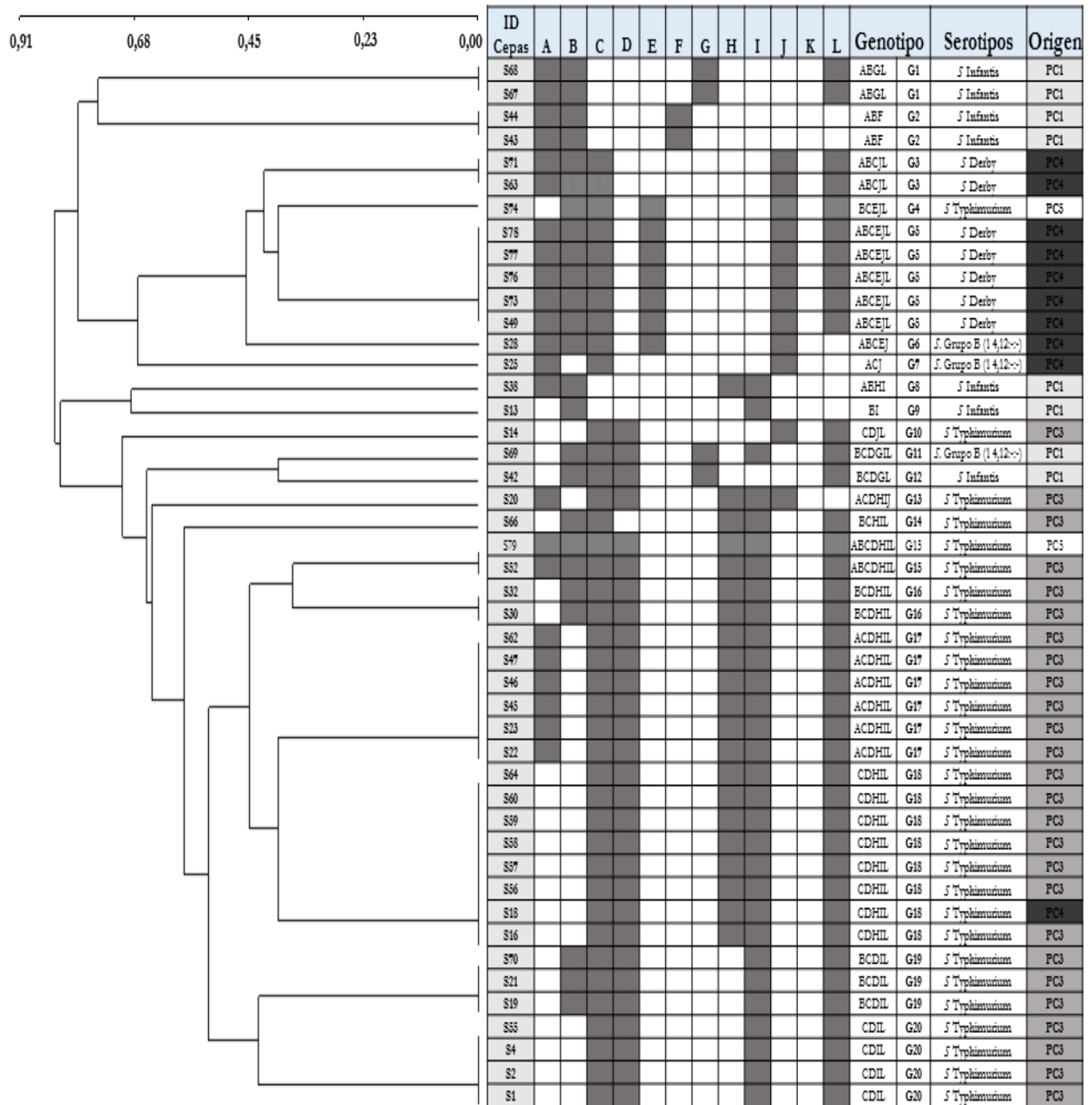


Figura 2. Dendrograma de cepas de *S. enterica* aisladas desde cerdos. En cuadros negros se indica la presencia de los genes específicos (Patrón de amplificación) mediante un código de letras desde la A hasta la L. Para una mejor visualización, los 20 genotipos también se representan con la letra G seguido de un número de 1 al 20 seguido del serotipo y el plantel comercial de origen (PC1-5). El dendrograma se obtuvo utilizando el método de agrupamiento de encadenamiento promedio (UPGMA) y el cálculo de la distancia de Jaccard mediante el programa estadístico Infostat®.

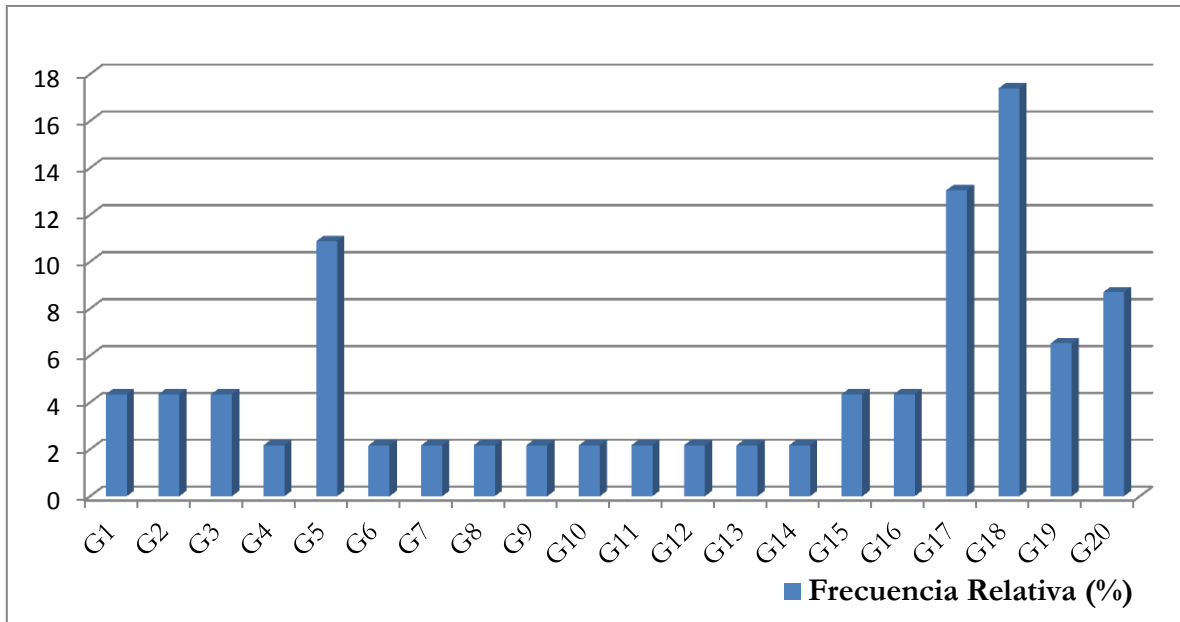


Figura 3. Frecuencia relativa de los 20 genotipos identificados en las 46 cepas de *Salmonella* de este estudio ($p > 0,05$).

Tabla 11. Determinación y distribución de genes y perfiles de virulencia en cepas de *Salmonella* aisladas desde cerdos.

Combinación de genes de Virulencia							Perfiles de Virulencia	Número de cepas por Perfil
<i>spvC</i>	<i>pagK</i>	<i>sirA</i>	<i>gipA</i>	<i>SEN1417</i>	<i>prot6e</i>	<i>pefA</i>		
0	0	1	0	0	0	1	0010001	2
0	1	0	0	0	0	0	0100000	1
0	1	1	0	0	0	0	0110000	6
0	1	1	0	0	0	1	0110001	3
0	1	1	1	0	0	1	0111001	5
0	1	1	1	1	0	1	0111101	4
1	1	0	0	0	0	1	1100001	1
1	1	1	0	0	0	0	1110000	1
1	1	1	0	0	0	1	1110001	3
1	1	1	1	0	0	1	1111001	7
1	1	1	1	1	0	0	1111100	1
1	1	1	1	1	0	1	1111101	12
Total							12	46

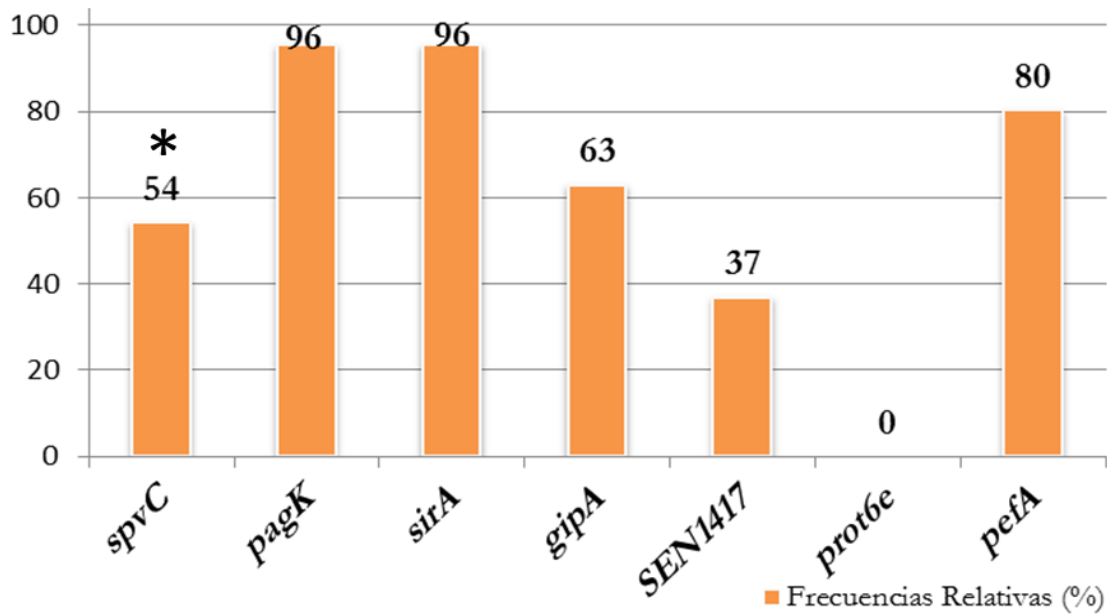


Figura 4. Frecuencia relativa de los genes de virulencia en estas cepas de Salmonella. Solo se determinó asociación significativa con genotipos a la secuencia *spvC* ($p \leq 0,05$).

1.1. Determinación de genes y perfiles de resistencia antimicrobiana

Se determinó la presencia de genes *tetA*, *tetB*, *tetG*, *blaPSE-1*, *blaTEM* y *blaCMY* (Tabla 12), así como sus frecuencias en las distintas cepas presentadas en la Figura 5. Con respecto a la distribución de la combinación de genes de resistencia a los antimicrobianos, no hubo asociación significativa ($p > 0,05$) de ningún de estos genes en los distintos genotipos.

Tabla 11. Determinación y distribución de genes y perfiles de Resistencia antibiótica en cepas de *Salmonella*

Combinación de genes de Resistencia Antimicrobiana								Perfiles de Resistencia Antimicrobiana	Número de cepas por Perfil
<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetG</i>	<i>BlaPSE-1</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaCMY</i>	<i>aadB</i>	<i>aacC</i>		
0	0	0	0	0	0	0	0	00000000	3
0	0	0	0	1	0	0	0	00001000	3
0	1	0	0	1	0	0	0	01001000	1
1	0	0	0	0	0	0	0	10000000	10
1	0	0	0	1	0	0	0	10001000	27
1	1	0	0	1	0	0	0	11001000	2
Total								6	46

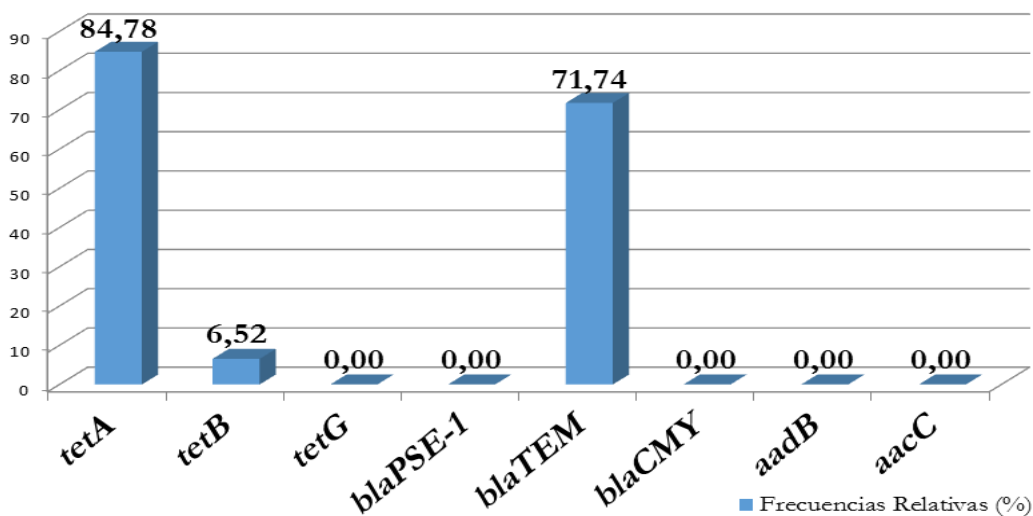


Figura 5. Frecuencia relativa de los genes de resistencia antibiótica en cepas de *Salmonella*. ($p > 0,05$).

4. 4. Determinación de la diversidad de cepas en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana.

Se identificaron 22 patrones genéticos o virulotipos, en donde los más prevalentes fueron **M**, **P** y **R**, pertenecientes al mismo serotipo *S. Typhimurium* (**Figura 6**). De los 46 aislados de *Salmonella* analizados, se observaron 2 clústeres (A y B), y dentro del primero, varios sub-clúster. Al relacionarlos con el origen, los virulotipos oriundos del plantel comercial 1 (**PC1**) se agrupan más cercanamente con los del plantel 3 (**PC3**) y estos a su vez, se acercan a los del Plantel 5 (**PC5**) y por fin a los del plantel 4 (**PC4**) (**Figura 7**).

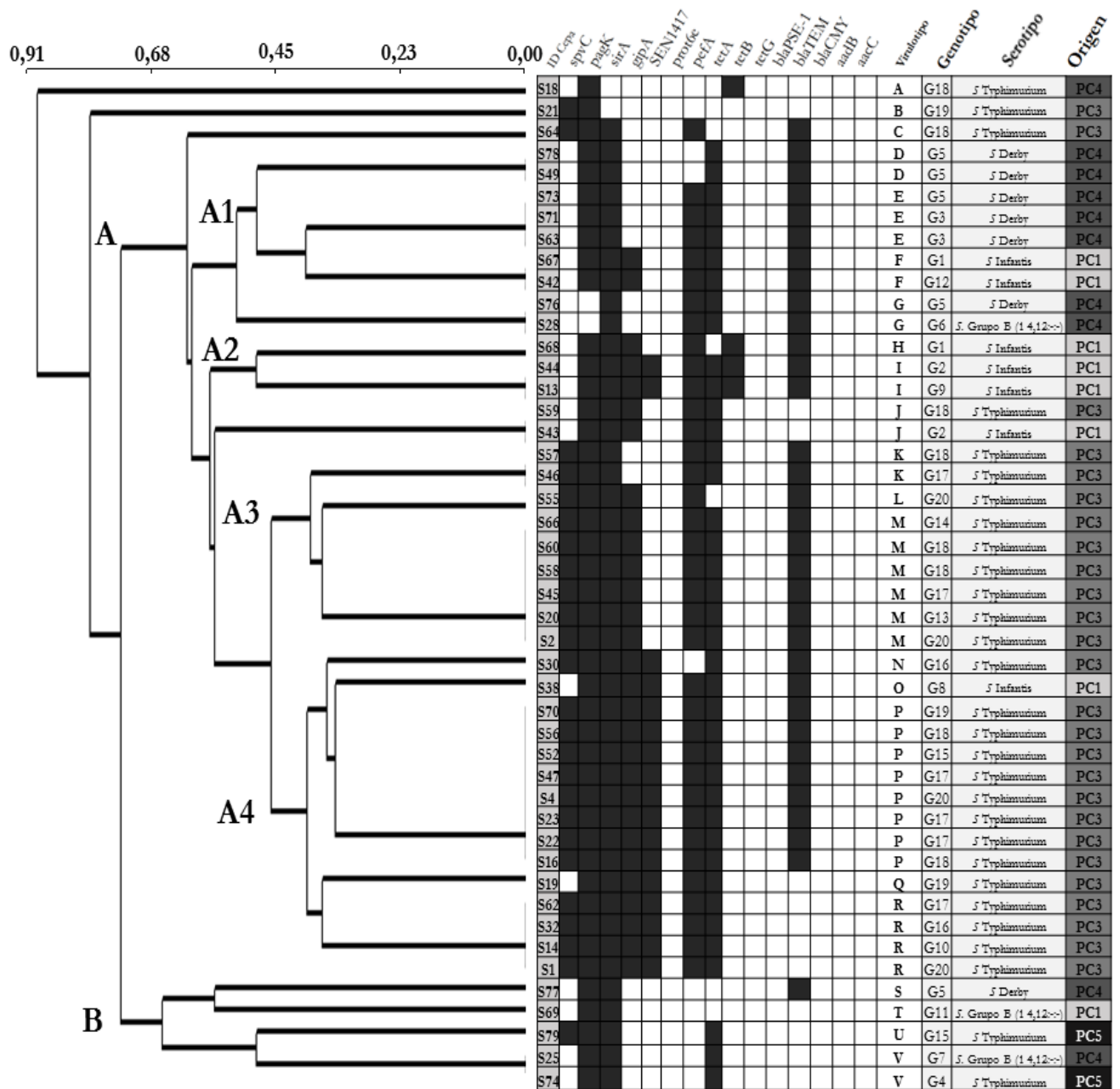


Figura 6. Dendrograma de cepas de *S. enterica* aisladas desde cerdos en base a perfiles genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana (Virulotipos). En cuadros negros se indica la presencia del gen descrito arriba y su ausencia en blanco. Los virulotipos se representan mediante un código de letras de **A** hasta **V**. Los 20 genotipos corresponden a los de la figura 2 representado con la letra G seguido de un número de 1 al 20 seguido del serotipo y el plantel comercial de origen (**PC1-5**). El dendrograma se obtuvo utilizando el método de agrupamiento de encadenamiento promedio (UPGMA) y el cálculo de la distancia de Jaccard del programa estadístico Infostat®.

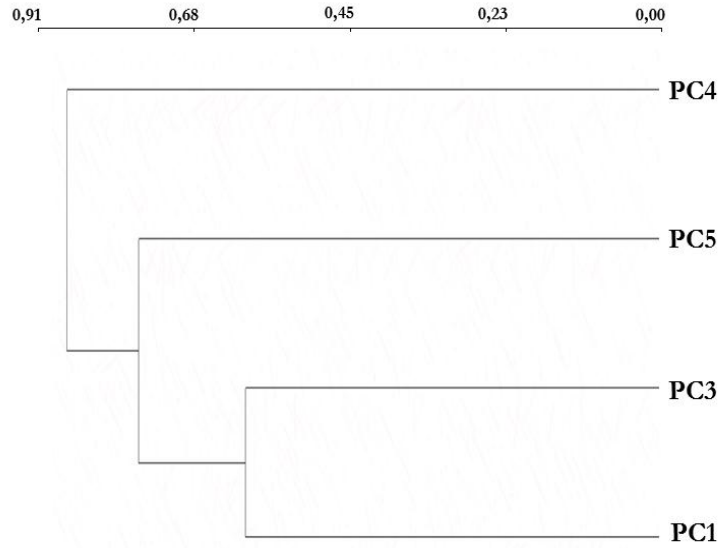


Figura 7. Dendrograma de cepas de *S. enterica* aisladas desde cerdos en base a perfiles genéticos asociados a su origen Planteles Comerciales (PC1-5). El dendrograma se obtuvo utilizando el método de agrupamiento de encadenamiento promedio (UPGMA) y el cálculo de la distancia de Jaccard del programa estadístico Infostat®.

V. DISCUSIÓN

5.1. Genotipificación

En este estudio, se llevaron a cabo experimentos de PCR múltiple, para genotipificar cepas de *S. enterica* (Beaubrun *et al.*, 2012), aisladas de muestras de linfonodos mesentéricos porcinos de plantales comerciales que cuentan con un alto nivel tecnológico y alto estándar sanitario. Consiste en un método rápido, preciso y rentable que puede discriminar los serotipos de los aislados clínicos más comunes de *S. enterica* subsp. *Enterica* (Kim *et al.*, 2006).

En nuestro trabajo (Figura 1), el método se mostró bastante sensible y específico, por lograr discriminar entre las distintos serotipos y aislados, y por ser un método sensible y rentable, se podría usar fácilmente por los organismos reguladores para controlar la calidad y la seguridad de los alimentos con un tiempo y un costo muy reducidos (Chin *et al.*, 2017; Vieira-pinto *et al.*, 2012).

En este trabajo se observó la presencia de 20 patrones genotípicos distintos en las 46 cepas evaluadas (Figura 2). Sin embargo, dentro de cada serotipo se observaron diversos patrones genéticos, lo que contrasta con los reportes previos (Kim *et al.*, 2006; Beaubrun *et al.*, 2012; Beaubrun *et al.*, 2014), que sugieren la existencia de un solo patrón genotípico en cada serotipo. La variabilidad genética de estas cepas podría explicar el hallazgo, considerando que fueron aisladas desde un hospedero y una región geográfica distinta (Kottwitz *et al.* 2010). Esto también quedó demostrado por los distintos patrones genotípicos del mismo serotipo Newport, ABCE (Kim *et al.*, 2006), ABCEI (Beaubrun *et al.*, 2012) y ABCEJ (Beaubrun *et al.*, 2014), lo que sugiere un grado de flexibilidad de este método por expresar la variabilidad dentro de un mismo serotipo. Esto sería una desventaja si el objetivo es una relación directa genotipo-serotipo, pero su capacidad de discriminar cepas dentro de un serotipo podría facilitar distintas fuentes de infección al interior de un plantel. Además, es importante el hecho de que un mismo patrón genotípico no fuera compartido entre dos o más serotipos, manteniendo la especificidad del análisis.

Cada plantel comercial estuvo asociado principalmente a un solo serotipo los cuales fueron *S. Infantis*, *S. Typhimurium* y *S. Derby*, con la excepción de las cepas *Salmonella* Grupo B(1, 4,12:-:-) presentes en los plantales 1 y 4. La presencia y abundancia relativa de estos serotipos

aislados desde cerdos es concordante con hallazgos previos, habiéndose reportado los serotipos Infantis, Grupo E (3,9:-:-); Typhimurium, Derby y Enteritidis (Junod et al. 2013) (Martin JI 2016).

El serotipo Typhimurium fue el más frecuente en este estudio, y también el que demostró mayor variabilidad genotípica, este hallazgo puede relacionarse al mayor número de cepas identificadas de este serotipo, (Litrup *et al.* 2010), aunque también por el hecho de tratarse de cepas en clara evolución por la pérdida o adquisición horizontal de genes y/o profagos y polimorfismos nucleotídicos en una escala de tiempo muy corto (Brüssow *et al.* 2004). Este proceso desencadena reordenamientos genómicos compensadores con el fin de mantener la estabilidad del genoma (Buijuy, 2011). Sin embargo, estos reordenamientos genéticos parecen ser más importantes en bacterias especie-específicas, como *Salmonella* Typhi, debido a procesos de recombinación en los operones de ARN ribosómico. En cambio, los serotipos generalistas como *S.* Typhimurium tendrían una disposición cromosómica más conservada, como consecuencia de sus distintos estilos de vida (Helm *et al.*, 2003).

La alta frecuencia de los genes C, D, H, I y L (**Figura 2**), parecen determinar cierta estabilidad estructural para la identificación de este serotipo, asociado también a la alta frecuencia del gen de virulencia *spvC* (**Figura 6**). Mientras que la presencia de los genes A, B, C, J y L en todas las cepas de *S.* Derby (**figura 2**) y la ausencia total de los genes de virulencia *spvC*, *gipA*, *SEN1417* y *prot6e* (**Figura 6**) caracterizaron este serotipo. En cambio el serotipo Infantis fue el más heterogéneo, presentando patrones genotípicos muy diversos en las distintas cepas y compartiendo además genes que están igualmente distribuidos en los demás serotipos (**Figuras 2 y 6**).

Por otra parte, Typhimurium es el segundo serotipo más prevalente (13,7%) en brotes de salmonelosis humana en Chile (ISPCH, 2016), siendo Enteritidis el más importante (60,6%). Esto sugiere que la carne porcina no es la principal fuente de brotes de salmonelosis en el país, aunque el riesgo está presente y las medidas de prevención deben ser permanentemente implementadas para evitar la enfermedad.

La presencia de 20 genotipos distintos en estos plantales, constituye un hallazgo preocupante, pues sugiere que existen diversas fuentes de infección y vías de transmisión afectando a estos plantales. Entre estas variables se pueden mencionar: a) el origen de los cerdos (Cresa, 2008), b)

posible contaminación en los planteles de engorda por contacto directo y/o indirecto con seres humanos, animales domésticos o aves silvestres (Rivera Calderon *et al.*, 2012), c) presencia de moscas que pueden ser vehículos de transmisión de *Salmonella* (Xu *et al.*, 2018), d) animales portadores provenientes de lotes que hayan sido afectados por brotes de enterocolitis por *Salmonella spp*, en la cadena de producción de carne de cerdo (Tavechio & Domingues, 2005), y e) el papel de la estabulación de larga duración que influye en la contaminación de cerdos (Bonardi *et al.*, 2016). Por este motivo, la inclusión de pruebas rutinarias y la categorización de rebaños de animales con respecto a su estado de infección con *S. enterica* son componentes importantes de los programas integrados destinados a reducir su prevalencia en la cadena alimentaria (Tavechio & Domingues, 2005).

5.2. Perfiles de Virulencia

La gran diversidad de perfiles de virulencia (Tabla 11) puede tener relación con el hecho de haber 20 genotipos distintos circulando en estos predios. Estos resultados coinciden con lo descrito por (Morales & Retamal 2012), al relacionarlas con el hospedero o la zona geográfica de origen de las cepas.

Entre los genes asociados a funciones de virulencia, solo el gen *prot6e* no se detectó en ninguna de las cepas en estudio, lo que sugiere la presencia de cepas que no poseen fimbrias codificadas por este gen (Huehn *et al.*, 2009). Es probable que *prot6e* se encuentre en algunos serotipos específicos, como lo describe Huehn *et al.*, (2010), quienes identificaron esta secuencia exclusivamente en el serovar Enteritidis.

Por otra parte, se detectó una asociación significativa ($p < 0,05$) entre el gen *spvC* en los distintos genotipos de *S. Typhimurium* (**Figura 6**), lo que significa que el plásmido que aporta este gen no se encuentra distribuido uniformemente en todos ellos, como quedó demostrado su ausencia en cepas de la fiebre tifoidea, pero fuertemente asociados con cepas que causan bacteriemia no tifoidea (Guiney & Fierer 2011). Sin embargo, también se han reportado diferencias significativas con los otros genes plasmidiales *pefA* y *prot6e* (Morales & Retamal, 2012), lo que sugiere que este conjunto de genes se encuentran asociados a serotipos específicos, como se ha demostrado en cepas de *S. Typhimurium* (Li *et al.*, 2017) y de *S. Enteritidis* (Fardsanei *et al.*, 2017), y su ausencia en cepas de *Salmonella spp*, aisladas de la carne (Oueslati *et al.*, (2016).

5.3. Resistencia Antimicrobiana

Hoy en día, uno de los principales problemas de salud pública asociados con las bacterias es la presencia de microorganismos patógenos resistentes a una amplia gama de antibióticos, por lo que la presencia de genes responsables de esta resistencia pueden marcar una diferencia en su patogenicidad (Lamas *et al.*, 2018).

El uso de agentes antimicrobianos en animales de granja puede promover el desarrollo de resistencia antimicrobiana en *Salmonella*, con potencial de transmisión a humanos a través del consumo de alimentos o contacto directo (Kore *et al.*, 2017). La presencia de diversos genes o factores de resistencia a los antibióticos en estas cepas, inviabiliza el uso de fármacos de uso comunes como ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfometoxazol, tetraciclina, trimetoprim, kanamicina y gentamicina, ácido nalidíxico, sulfonamida y tetraciclina tanto en salud humana como animal (Papadopoulos *et al.*, 2017). Existe además el potencial de transmisión y selección de cepas resistentes a seres humanos (De Toro *et al.*, 2014). La contaminación cruzada durante el sacrificio también facilita la diseminación de los genes de resistencia a los consumidores, relevando la importancia del control de *Salmonella* durante el sacrificio para la salud pública, requiriéndose un manejo de higiene estricto en consideración de los Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés) (Zhu *et al.*, 2017).

En este estudio, la prevalencia de detección de los genes *tetA* y *blaTEM* fue de un 85 y 72% respectivamente, existiendo variaciones en diferentes genotipos de los distintos planteles, similar a un estudio previo en donde el 92% de los aislados mostraron un fenotipo de multiresistencia, siendo el gen *blaTEM-1* el más frecuentemente detectado (63,5%), (De Toro *et al.*, 2014). La razón de esta variación puede estar relacionada con las diferencias en la frecuencia y el tipo de genes de resistencia antimicrobiana transferibles transportados por aislados de *Salmonella* originarios de canales recolectadas de diferentes lugares o de la estación del año (Qiao *et al.*, 2017).

La alta prevalencia de resistencia a las tetraciclinas y sulfonamidas probablemente se deba al uso común de estos antimicrobianos en granjas porcinas, y de tilosina y penicilina en las granjas porcinas asociadas al aumento de la resistencia a los antimicrobianos β -lactámicos en *E. coli* y *Salmonella* (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2017), ya que las serovariedades que no codificaron

a ningún determinante de resistencia antimicrobiana, fueron susceptibles a 17 agentes antimicrobianos probados (Huehn *et al.*, 2009). En contraste, el 94,6% (n = 157) de aislados resistentes a betalactámicos albergaba al menos un gen de resistencia de *bla*TEM o *bla*CTX-M.(Zhu *et al.*, 2017).

5. 4. Dendograma

En nuestro estudio, se obtuvieron 22 virulotipos (perfiles de genes asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana), que se agruparon principalmente por su fuente de origen. El motivo de esta variación (Acar *et al.*, 2017), puede estar relacionado con las diferencias en la frecuencia y el tipo de genes transferibles de virulencia y resistencia antimicrobiana transportados por aislados de *Salmonella* originados en diferentes lugares y estaciones del año. Estudios previos también indicaron que *Salmonella* y otras enterobacterias que producen beta-lactamasas, difieren según el serotipo, por países y regiones geográficas dentro y entre las serotipos y por tipos de alimentos (Qiao *et al.*, 2017).

La presencia de varias cepas pertenecientes al mismo genotipo y serotipo, que además poseen el mismo virulotipo (G3), sugiere que están muy relacionadas entre ellas (Huehn *et al.*, 2010). Sin embargo, también se observaron genotipos que portaban distintos virulotipos (Ejemplo G17 y G18), lo que sugiere variabilidad en los genes de virulencia al estar codificados por profagos, grupos fimbriales o en plásmidos de virulencia (Huehn *et al.*, 2010), ya que la adquisición y la pérdida de dicho material en los genomas bacterianos se ha explicado como un modo rápido de evolución (Brüssow *et al.*, 2004). Este hecho determina la necesidad de caracterización de cepas que pueden tener efectos en la salud pública y salud animal, para mejorar la detección de la propagación de agentes zoonóticos emergentes (Huehn *et al.*, 2009). Las serovariedades detectadas se han vinculado a brotes clínicos en humanos y animales en todo el mundo y en Chile, destacando la importancia del sistemas de producción en el control y diseminación de serovares de *Salmonella* potencialmente peligrosos para la salud pública (Alegria-Moran *et al.* 2017).

La coexistencia de genes de virulencia y determinantes de resistencia en el mismo plásmido se debe a los integrones, que son elementos de ADN capaces de capturar y movilizar genes de resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias. Los integrones de clase 1 son los tipos de

integrones más comunes identificados en *Salmonella* resistente a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés) y juegan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia entre patógenos (Wannaprasat *et al.*, 2011).

La asociación de genes de virulencia y resistencia en cepas clonalmente relacionadas plantea la conveniencia de vigilar su evolución y establecer los reservorios y las vías de propagación que podrían explicar su aparición en aislados clínicos y se precisa de estudios epidemiológicos constante que permitan vigilar la evolución de la resistencia y la aparición de clones que aúnan resistencia y virulencia (De Toro *et al.*, 2014).

VI. CONCLUSIONES

En esta investigación pudimos confirmar que el de PCR múltiple es un método rápido y rentable que puede discriminar cepas de *S. enterica*, en un tiempo significativamente menor al método de serotipificación actual.

Las cepas de *S. enterica* analizadas en este trabajo poseían diversos genes o factores de virulencia que contribuyen para la patogenicidad, lo que podría causar colonización, infección y enfermedad en humanos y animales.

Se detectó un bajo número de determinantes de resistencia a los antimicrobianos, pero lo suficiente para demostrar la presión evolutiva que ejerce el uso común de antimicrobianos sobre estas cepas. Es esencial la reducción del uso de antibióticos con nuevas políticas y cooperación intersectorial a nivel nacional e internacional para promover el uso racional en los sistemas de producción de alimentos con buenas prácticas de higiene y gestión en la granja y en el matadero.

Nuestros resultados revelaron que los aislados de *Salmonella* compartieron perfiles de genes de virulencia y de resistencia antimicrobianas que confirman la hipótesis de circulación de varias cepas al interior de estos planteles, lo que representa una amenaza para la salud pública por su efecto en la inocuidad alimentaria y que obliga a implementar estrategias de intervención más efectivas, lo que destaca la importancia de la investigación.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Acar, S. *et al.*, 2017. Phenotyping and genetic characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography. *International Journal of Food Microbiology*, 241, pp.98–107.
- Alegria-Moran, R. *et al.*, 2017. First detection and characterization of *Salmonella* spp. in poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. *Epidemiology and Infection*, pp.1–11.
- Beaubrun, J.J.-G. *et al.*, 2014. Comparison of a PCR serotyping assay, Check&Trace assay for *Salmonella*, and Luminex *Salmonella* serotyping assay for the characterization of *Salmonella enterica* identified from fresh and naturally contaminated cilantro. *Food Microbiology*, 42, pp.181–187. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.008>.
- Beaubrun, J.J.-G. *et al.*, 2012. The evaluation of a PCR-based method for identification of *Salmonella enterica* serotypes from environmental samples and various food matrices. *Food Microbiology*, 31(2), pp.199–209. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.016>.
- Bonardi, S. *et al.*, 2016. Detection of *Salmonella enterica* in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 218, pp.44–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.005>.
- Brüssow, H. *et al.*, 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), pp.560–602.
- Buijuy, C.J.B., 2011. Characterization of the Type VI Protein Secretion System encoded in the *Salmonella* Pathogenicity Island 19 and its role in the pathogenicity of serotypes *Gallinarum* and *Enteritidis*. , (May).
- Carlson, S.A. *et al.*, 1999. Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. , pp.213–222. Disponible en: <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=53830&content=PDF>.

- Castro, R.F., 1981. Epizootiología de la salmonelosis en bovinos, porcinos y aves. *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias S.A.R.H. Palo Alto, México*. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c05.pdf>.
- CFSPH, T.C. for food security and P.H., 2006. Salmonelosis paratifoidea, no tifoidea Última. , pp.1–2. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/salmonelosis.pdf>.
- Chin, W.H. *et al.*, 2017. Direct PCR – A rapid method for multiplexed detection of different serotypes of Salmonella in enriched pork meat samples. *Molecular and Cellular Probes*, 32, pp.24–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2016.11.004>.
- Cresa, 2008. Salmonelosis. (*Centre de Recerca en Sanitat Animal*). Disponible en: www.cresa.es/granja/salmonelosis.php.
- Cubillos, D.A.P., 2009. Aislamiento, Identificación y Serotipificación de Enterobacterias del género Salmonella en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B de la Facultad de Ciencia. *Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio – Meta*.
- Deng, L. *et al.*, 2014. Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen salmonella typhi. *Cell* 159, 1290–1299, December 4, 2014 ^a2014 Elsevier Inc, 159(6), pp.1290–1299.
- Fardsanei, F. *et al.*, 2017. Genetic diversity and virulence genes of Salmonella enterica subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microbial Pathogenesis*, 107, pp.451–456. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.026>.
- Fica, A. *et al.*, 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde Salmonella typhi a Salmonella enteritidis. *Rev Chil Infect*, 18(2), pp.85–93.
- Fresno, M. *et al.*, 2013. Identification of diverse Salmonella serotypes, virulotypes, and antimicrobial resistance phenotypes in waterfowl from Chile. *Vector borne and zoonotic diseases*, 13(12), pp.4–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24107205>.
- Fresno, M. & Retamal, P., 2011. Determinación de la supervivencia a condiciones de estrés de cepas de Salmonella enterica serovar Enteritidis aisladas desde humanos, gaviotas y aves comerciales. *Universidad de Chile*. Disponible en:

<http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/133941>.

Gil-Setas, A. *et al.*, 2002. Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España.

Revista Española de Salud Pública, 76(1), pp.49–56. Disponible en:

<http://scielo.isciii.es/pdf/resp/v76n1/a06v76n1.pdf>.

Grimont, P.A.D. & Weill, F.-X., 2007. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. *WHO*

Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, (9th edition), p.166. Disponible

en: <http://0-www.worldcat.org.novacat.nova.edu/identities/lccn-n92069052/>.

Guiney, D.G. & Fierer, J., 2011. The role of the spv genes in Salmonella pathogenesis. *Frontiers*

in Microbiology, 2(JUNE).

Helm, R.A. *et al.*, 2003. Genomic Rearrangements at *rrn* Operons in Salmonella. *Genetics*,

165(3), pp.951–959.

Hernandez, V. *et al.*, 2011. Aislamiento e identificación de Salmonella spp. en carne fresca de

origen porcino. *ResearchGate*. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/272566986%0AAislamiento>.

Huehn, S. *et al.*, 2009. Poultry-associated Salmonella enterica subsp. enterica serovar 4,12:d:-

reveals high clonality and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Applied and*

Environmental Microbiology, 75(4), pp.1011–1020.

Huehn, S. *et al.*, 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of Salmonella enterica

serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne pathogens and disease*, 7(5), pp.523–

535.

IDEXX, 2010. Prueba IDEXX Swine Salmonella Ab. *al.idexx.com/salmonella*. Disponible en:

http://www.idexx.es/pdf/es_es/livestock-poultry/swine-salmonella-ab-test-sheet.pdf.

ISPCH, 2014. Boletín IPS: Vigilancia de laboratorio Salmonella spp. 2009-2014. *Instituto de*

Salud Pública Chile, 4(10), pp.1–5. Disponible en:

[http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletín Salmonella 2009-2014 \(23-10-2014\) .pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletín%20Salmonella%202009-2014%20(23-10-2014).pdf).

ISPCH, 2016. Salmonella spp. 2012-2016 6,. *BOLETÍN VIGILANCIA DE LABORATORIO*

Salmonella, pp.2012–2016. Disponible en:

http://www.ipsuss.cl/ipsuss/site/artic/20170329/asocfile/20170329104802/isp_boletin_salmonella_23012017a.pdf.

ISPCH, 2010. Vigilancia Salmonella spp. *Instituto de Salud Pública Chile*. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/09/Vigilancia_Salmonella_spp.pdf.

Junod, T., López-Martin, J. & Gädicke, P., 2013. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Médica de Chile*, 141(3), pp.298–304.

Kim, S. *et al.*, 2006. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of Salmonella enterica subsp. enterica. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), pp.3608–3615. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/44/10/3608.full.pdf+html>.

Kore, K. *et al.*, 2017. Characterization of Salmonella isolated from apparently healthy slaughtered cattle and retail beef in Hawassa, southern Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 147(August), pp.11–16. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.08.018>.

Kottwitz, L.B.M. *et al.*, 2010. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum - Health Sciences*.

Lamas, A. *et al.*, 2018. A comprehensive review of non-enterica subspecies of Salmonella enterica. *Microbiological Research*, 206(October 2017), pp.60–73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>.

Li, K. *et al.*, 2017. Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of Salmonella enterica serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China. *Food Control*, 72, pp.36–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.032>.

Litrup, E. *et al.*, 2010. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of Salmonella enterica. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), pp.1132–1139. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.015>.

López, T.L.J., 2010. Susceptibilidad a antibióticos en Cepas de Salmonella enterica de origen

Animal y Alimentario. *Universidad de Concepción*,
(<http://repositorio.udec.cl/handle/11594/812>). Disponible en:
<http://repositorio.udec.cl/handle/11594/812>.

Lopez Cuevas, O. *et al.*, 2009. Detección y Resistencia a Antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), pp.119–126.

Lynne, A.M. *et al.*, 2008. Antimicrobial Resistance Genes Associated with *Salmonella enterica* Serovar Newport Isolates from Food Animals □ . , 52(1), pp.353–356.

Márquez, R.J.A., 2013. La Sanidad animal al servicio de la Salud Pública: El Paradigma de *Salmonella*. *ANALES (de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental)*, 26, p.35. Disponible en: www.insacan.org/racvao.ahtml.

Martin JI, L., 2016. Isolation and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in Fecal Samples from Animals. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2(1), pp.1–6. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/isolation-and-antimicrobial-susceptibility-of-salmonella-typhimurium-and-salmonella-enteritidis-in-fecal-samples-from-animals-antimicro-1000109.php?aid=70767>.

Méndez, I.A. *et al.*, 2011. Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. *Microbiological characterization of Salmonella in Street-vended foods an university sector in Bogotá, Colombia. July-October 2010.*, 24(1), pp.23–29. Disponible en:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=76362717&lang=es&site=ehost-live>.

Morales, N.A.P. & Retamal, P.M., 2012. Identificación de diferencias en la presencia de genes asociados a virulencia en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis aisladas desde distintos hospederos en Chile. *Universidad de Chile*.

Mosquito, S. *et al.*, 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28(4), pp.648–656.

Ng, L. *et al.*, 1999. Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Canadian Isolates of *Salmonella* Serovar Typhimurium DT104. *American Society for Microbiology*, 43(12),

pp.3018–3021. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/43/12/3018.full.pdf+html>.

- Ochoa, I.M.F. & Rodríguez, A.V., 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1–2), pp.25–42.
- Oueslati, W. *et al.*, 2016. Prevalence, virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater Tunis (Tunisia). *Meat Science*, 119, pp.154–159. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.037>.
- Pan, Z. *et al.*, 2009. Identification of genetic and phenotypic differences associated with prevalent and non-prevalent *Salmonella* Enteritidis phage types: Analysis of variation in amino acid transport. *Microbiology*, 155(10), pp.3200–3213.
- Papadopoulos, T. *et al.*, 2017. Multiple clones and low antimicrobial resistance rates for *Salmonella enterica* serovar Infantis populations in Greece. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 51, pp.54–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2017.02.002>.
- Qiao, J. *et al.*, 2017. Characterization of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 248, pp.72–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.016>.
- Randall, L.P. *et al.*, 2004. Antibiotic resistance genes , integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. , 53(2), pp.208–216. Disponible en: https://watermark.silverchair.com/api/watermark?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAdQwggHQBgkqhkiG9w0BBwagggHBMIIbVQIBADCCAbYGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMx6Ig_cbY7NH2ULM1AgEQgIIBh4GIMTSHeA4A8E609nbbedi8Qi_8HLTXIJcT2ioXMFla.
- Rivera Calderon, L.G. *et al.*, 2012. Resistance of *Salmonella* to conventional antimicrobials for their treatment. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(1), p.115–127. 81 ref. Disponible en: http://www.revistamvzces.com/revistas/vol7no1/Articulo_9.pdf; http://tc.liblink.umn.edu/sfx_local?sid=OVID:cabadb&id=pmid:&id=doi:&issn=1900-9607&isbn=&volume=7&issue=1&spage=115&pages=115-

127&date=2012&title=Revista+CES+Medicina+Veterinaria+y+Zootecnia&a.

- Samiullah, S., 2013. Salmonella infantis, a potential human pathogen has an association with table eggs. *International Journal of Poultry Science*, 12(3), pp.185–191.
- Sanchez-Maldonado, A.F. *et al.*, 2017. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from two pork processing plants in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 241, pp.49–59. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.004>.
- Tavechio, A.T. & Domingues, F.J., 2005. Prevalence of pigs infected by Salmonella Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. , 105, pp.267–271.
- Tirado, M.D.B. *et al.*, 2009. Evolución de los serotipos, fagotipos y resistencia a antimicrobianos de Salmonella sp en el departamento de salud 02 de la provincia de Castellón, España (2000-2006). *Rev Chil Infect* 2009; 26 (6): 520-527, 26(6), pp.520–527. Disponible en: www.sochinf.cl.
- De Toro, María Hernando Torres, C.M. & Sáenz, Y., 2013. Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en Salmonella enterica. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica.
- Toro, M. *et al.*, 2016. Whole-Genome Sequencing Analysis of Salmonella enterica Serovar Enteritidis Isolates in Chile Provides Insights into Possible Transmission between Gulls, Poultry, and Humans. *American society for microbiology*, 82(20), pp.6223–6232.
- De Toro, M. *et al.*, 2014. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de Salmonella enterica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), pp.4–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.006>.
- Valenzuela, C.A.S., 2009. Identificación de genes codificados en islas genómicas que contribuyen a la virulencia de Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Tesis.Uchile.Cl*. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-silva_ca/pdfAmont/qf-silva_ca.pdf.
- Vargas, D.A.O., 2008. Detección de Cuatro Genes de resistencia a Tetraciclinas en Bacterias Nosocomiales Gram Negativas, aisladas en recintos Hospitalarios Veterinarios.

Universidad de Chile. Disponible en:

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131394/Detección-de-cuatro-genes-de-resistencia-a-tetraciclinas-en-bacterias-nosocomiales-Gram-negativas%2C-aisladas-en-recintos-hospitalarios-veterinarios.pdf?sequence=1>.

Vieira-pinto, M. *et al.*, 2012. Relationship between tonsils and mandibular lymph nodes concerning *Salmonella* sp . infection. *FRIN*, 45(2), pp.863–866. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.023>.

Wannaprasat, W., Padungtod, P. & Chuanchuen, R., 2011. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), pp.457–461. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.12.001>.

Xu, Y. *et al.*, 2018. *Salmonella*, including antibiotic-resistant *Salmonella*, from flies captured from cattle farms in Georgia, U.S.A. *Science of the Total Environment*, 616–617, pp.90–96. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.324>.

Zhu, Y. *et al.*, 2017. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. , (July).