



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de serovares de *Salmonella*
enterica aislados de humanos y productos aviares,
mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
(PFGE)**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

André Felipe SEDANO SÁNCHEZ

ASESOR

Mg. Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sedano A. Caracterización molecular de serovares de *Salmonella enterica* aislados de humanos y productos aviares, mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	ANDRÉ FELIPE SEDANO SÁNCHEZ
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44931004
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3711-1970
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	SONIA YENNY CALLE ESPINOZA
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10321145
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4955-2378
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	DAPHNE DORIS RAMOS DELGADO
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07607293
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	LUIS MIGUEL JARA SALAZAR
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43235088
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	JUAN ALEXANDER RONDON ESPINOZA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07765647
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	
Tipo de documento	
Número de documento de identidad	

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.3.2. Inocuidad de los alimentos de origen animal.
Grupo de investigación	Microbiología Aplicada a la Salud Pública-Animal y de Impacto Ambiental - MASPAA
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de Investigación para Grupos de Investigación. A17081571- PCONFIGI.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Avenida: Circunvalación 28 Latitud: -12.08151 Longitud: -76.98773 Edificio: Instituto Nacional de Salud. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Jesús María Jirón: Cápac Yupanqui 1400 Latitud: -12.07826 Longitud: -77.04140
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2017 - diciembre 2017
URL de disciplinas OCDE	Salud pública, Salud ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05 Enfermedades infecciosas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08 Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL**

En la Sala de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 09:30 horas del día lunes 17 de marzo del 2025, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Dra. Daphne Doris Ramos Delgado y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Luis Miguel Jara Salazar, Mg. Juan Alexander Rondón Espinoza y la Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza (asesora), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis titulada:

“Caracterización molecular de serovares de *Salmonella enterica* aislados de humanos y productos aviares, mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)”,
presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

ANDRÉ FELIPE SEDANO SÁNCHEZ

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO, (17) DIECISIETE** _____

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, al Bachiller en Medicina Veterinaria André Felipe Sedano Sánchez.

Siendo las 10:45 horas del día lunes 17 de marzo de 2025, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Dra. Daphne Doris Ramos Delgado (P.P.D.E.)
Presidente

.....
Mg. Luis Miguel Jara Salazar
Miembro

.....
Mg. Juan Alexander Rondón Espinoza (P.A.D.E.)
Miembro

.....
Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza (P.P.D.E.)
Miembro Asesor

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado





CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, SONIA YENNY CALLE ESPINOZA en mi condición de asesora acreditada con la Resolución Directoral N°178-UPG-FMV-2017, de la tesis cuyo título es “**Caracterización molecular de serovares de *Salmonella enterica* aislados de humanos y productos aviares, mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)**”, presentado por el Bach. André Felipe Sedano Sánchez para optar el grado académico de magíster, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 11% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.



Firmado digitalmente por CALLE
ESPINOZA DE CAMACHO Sonia
Yenny FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 10.04.2025 16:20:31 -05:00

Firma del Asesor _____

Documento de Identidad: 10321145

Nombres y apellidos de la asesora: SONIA YENNY CALLE ESPINOZA



DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sonia Calle y Juan Siuce, del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la FMV-UNMSM, por sus consejos, paciencia y apoyo brindado para la ejecución de este estudio.

Al Dr. Ronnie Gavilán y Paul Fernández, del Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud; por su apoyo en la ejecución e interpretación de los resultados de este estudio.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el financiamiento para la ejecución del presente estudio.

INDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	6
RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
I. INTRODUCCION	6
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	9
2.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Salmonella</i>	9
2.1.1. Características del Género <i>Salmonella</i>	9
2.1.2. Nomenclatura y clasificación	10
2.1.3. Nicho ecológico.....	12
2.2. SALMONELOSIS EN ANIMALES	13
2.2.1. Reservorio animal de <i>Salmonella</i>	13
2.2.2. Salmonelosis en avicultura.....	13
2.3. SALMONELOSIS EN HUMANOS	16
2.3.1. Transmisión.....	16
2.3.2. Los alimentos como causa de salmonelosis humana.....	16
2.3.3. Epidemiología	17
2.4. <i>Salmonella</i> COMO PATÓGENO ALIMENTARIO DE ORIGEN ANIMAL	18
2.4.1. <i>Salmonella</i> en fuentes avícolas.....	18
2.5. VIGILANCIA DE SALMONELOSIS TRANSMITIDA POR LOS ALIMENTOS	19
2.6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>Salmonella</i>	20
2.6.1. Subtipificación microbiana.....	20
2.6.2. Esquemas de subtipificación molecular de <i>Salmonella</i> asociada a los alimentos	20
2.6.3. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Lugar de estudio	26
3.2. Muestras	26

3.3. Reactivación de aislados de <i>Salmonella</i>	30
3.4. Subtipificación molecular por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	31
3.4.1. Preparación de la muestra.....	31
3.4.2. Preparación de la suspensión celular.....	31
3.4.3. Preparación de Plugs de agarosa	31
3.4.4. Lisis celular en Plugs de agarosa.....	31
3.4.5. Lavado de Plugs de agarosa	32
3.4.6. Digestión del ADN con enzima de restricción <i>Xba</i> I	32
3.4.7. Separación de fragmentos de ADN mediante Electroforesis de Campo Pulsado	33
3.4.8. Tinción y documentación del gel de agarosa	33
3.5. Análisis de la información.....	33
IV. RESULTADOS	34
4.1. Perfiles de PFGE de <i>Salmonella</i> Typhimurium	34
4.2. Perfiles de PFGE de <i>Salmonella</i> Kentucky	35
4.3. Perfiles de PFGE de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	36
4.4. Perfiles de PFGE de <i>Salmonella</i> Infantis	37
V. DISCUSIÓN	41
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. CONCLUSIONES	49
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	50
IX. APÉNDICE	63

ABREVIATURAS Y SIGLAS

BSC: Buffer de suspensión celular

BLC: Buffer de lisis celular

Buffer TE: Buffer Tris EDTA

Buffer TBE: Buffer Tris-Borato EDTA

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades

CRISPR: Análisis de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas

ECDC: Centro Europeo para la prevención y control de las Enfermedades

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ETA: Enfermedades transmitidas por los alimentos

INS: Instituto Nacional de Salud

MLST: Tipificación de secuencia de multilocus

MLVA: Análisis repetido en tándem de número variable de multilocus

OMS: Organización Mundial de la Salud

PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

SNT: *Salmonella* no tifoidea

SNP: Análisis de polimorfismos de nucleótido

TSA: Agar tripticasa de soya

TSB: Caldo tripticasa de soya

UPGM: Unweighted Pair Method with Arithmetic Averages

WGS: Secuenciación del genoma completo

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades de mayor impacto en la salud pública por el gran número de casos de gastroenteritis de origen alimentario y defunciones en todo el mundo. En el país se viene reportando serovares de *Salmonella* no tifoidea (SNT) en casos humanos que estarían relacionados a los hallados en huevos comerciales, carcasas de pollos de engorde y subproductos de estos. El estudio tuvo como objetivo determinar mediante la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) el porcentaje de similitud de los perfiles genéticos (pulsotipos) de los serovares de SNT aislados de humanos y productos aviares, para conocer la relación de estos. Para ello, se obtuvieron 49 aislados bacterianos de serovares de SNT obtenidos de casos clínicos humanos y productos aviares (huevos comerciales, carcasa de pollo de engorde, vísceras y muestras ambientales de granja), los cuales se caracterizaron genéticamente mediante PFGE. Con ayuda del programa Bionumerics 7.0. se generó un dendrograma que muestra la relación *XbaI* – perfiles PFGE para las salmonelas en estudio. El análisis de las bandas generadas se realizó mediante el uso del método de UPGM (*Unweighted Pair Method with Arithmetic Averages*) para evaluar la relación genética de los aislados. Se estableció como valor de corte 90% de similitud entre los pulsotipos para establecer si están relacionados. Los aislados de origen humano y aviar de *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis, Kentucky e Infantis presentaron perfiles PFGE con porcentajes de similitud mayores o iguales a 88.2%, 68.5%, 83.2% y 93.0% respectivamente.

Palabras clave: *Salmonella*, humanos, huevos comerciales, pollo de engorde, PFGE, pulsotipos

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the diseases with the greatest impact on public health due to the large number of cases of food-borne gastroenteritis and deaths worldwide. In the country, serovars of non-typhoid Salmonella (SNT) have been reported in human cases that would be related to those found in commercial eggs, broiler chicken carcasses and their by-products. The objective of the study was to determine, using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), the percentage of similarity of the genetic profiles (pulso types) of NTS serovars isolated from humans and avian products, to know their relationship. To this end, 49 bacterial isolates were obtained from TNS serovars obtained from human clinical cases and avian products (commercial eggs, broiler chicken carcass, viscera and farm environmental samples), which were genetically characterized using PFGE. With the help of the Bionumerics 7.0 program. A dendrogram was generated that shows the relationship XbaI – PFGE profiles for the salmonellae under study. The analysis of the bands generated was carried out by using the UPGM (Unweighted Pair Method with Arithmetic Averages) method to evaluate the genetic relationship of the isolates. A cut-off value of 90% similarity between the pulse types was established to establish whether they are related. The isolates of human and avian origin of Salmonella Typhimurium, Enteritidis, Kentucky and Infantis presented PFGE profiles with similarity percentages greater than or equal to 88.2%, 68.5%, 83.2% and 93.0% respectively.

Keywords: Salmonella, humans, commercial eggs, broiler chicken, PFGE, pulse types

LISTA DE CUADROS

	Descripción	Pág.
Cuadro 1	Resumen de los métodos de subtipificación de <i>Salmonella</i>	24-25
Cuadro 2.	Lista de aislados criopreservados de los serovares de SNT de pacientes humanos con diarrea, obtenidos durante el periodo 2012-2017 en el departamento de Lima.	27
Cuadro 3.	Lista de aislados criopreservados de los serovares de SNT de origen aviar, obtenidos durante el periodo 2012-2017 en el departamento de Lima.	28-29
Cuadro 4.	Preparación del Master Mix para la enzima de restricción <i>Xba</i> I.	31
Cuadro 5.	Pulsotipos de <i>Salmonella</i> Typhimurium según su origen y año de aislamiento.	34
Cuadro 6.	Pulsotipos de <i>Salmonella</i> Kentucky según su origen y año de aislamiento.	35
Cuadro 7.	Pulsotipos de <i>Salmonella</i> Enteritidis según su origen y año de aislamiento.	36
Cuadro 8.	Pulsotipos de <i>Salmonella</i> Infantis según su origen y año de aislamiento.	39

LISTA DE FIGURAS

	Descripción	Pág.
Figura 1.	Análisis de PFGE de aislados de <i>Salmonella</i> Typhimurium obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.	34
Figura 2.	Análisis de PFGE de aislados de <i>Salmonella</i> Kentucky obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.	35
Figura 3.	Análisis de PFGE de aislados de <i>Salmonella</i> Enteritidis obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.	36
Figura 4.	Análisis de PFGE de aislados de <i>Salmonella</i> Infantis obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.	38

LISTA DE ANEXOS

	Descripción	Pág.
Anexo A1	Preparación de buffer de suspensión celular (BSC)	62
Anexo A2	Preparación de buffer de lisis celular (BLC)	62
Anexo A3	Preparación de buffer TE	62
Anexo A4	Preparación de buffer Tris- Borato EDTA 10X (TBE)	62
Anexo A5	Protocolo de Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) PulseNet (2013)	62-67
Anexo A6	Flujograma del protocolo de PFGE	68

I. INTRODUCCION

Salmonella es la bacteria responsable de la más alta carga de enfermedad que cualquier otro patógeno transmitido por los alimentos. El modo más común de transmisión de *Salmonella* es a través de la ruta fecal-oral, cuando se ingieren alimentos como: carne, huevos, lácteos, queso, mariscos, frutas y vegetales contaminados (Smith *et al.*, 2018); sin embargo, los alimentos de origen animal son la principal vía de transmisión para los humanos (Ferrari *et al.*, 2019).

Las principales fuentes de contaminación por *Salmonella* provienen de la producción primaria (granjas), plantas de alimento para animales y plantas de faenamiento. Otra fuente de potencial contaminación, ocurre durante el envasado, distribución y comercialización de alimentos (Gómez *et al.*, 2012). Recientemente, en EE.UU. se han producido grandes brotes en restaurantes, instituciones para niños, hospitales y hogares de ancianos. En 2010, un brote en EE.UU., con más de 2,000 casos reportados, resultó de la contaminación en la cadena de producción de alimentos, lo que llevó a un retiro masivo de más de medio billón de huevos (Cummings *et al.*, 2012).

En la Unión Europea, los serovares no tifoideos (SNT): *S. Enteritidis* (48.7%), *S. Typhimurium* (12.4%), *S. Typhimurium* monofásico (11.1%), *S. Infantis* (12.4%) y *S. Derby* son los serovares más importantes en salud pública, reportados a partir de 694 brotes transmitidos por los alimentos en 2020. Los alimentos más comúnmente implicados en los brotes por *Salmonella*

fueron los huevos y ovoproductos, seguidos de la carne de cerdo. *S. Enteritidis* se relacionó principalmente con fuentes de pollos de engorde, con ponedoras y huevos (EFSA, 2021).

Los brotes de salmonelosis continúan ocurriendo, a pesar de las medidas de bioseguridad adoptadas; esto puede deberse a la falta de conciencia sobre los problemas de salud animal y al difícil control de este microorganismo debido a la amplia distribución y variedad de formas de transmisión de *Salmonella*, y al gran número de alimentos involucrados en brotes de salmonelosis. Se deben implementar programas para guiar y sensibilizar a los consumidores, el comercio, los manipuladores de alimentos y los criadores de animales, principalmente de aves de corral. (Castiglioni *et al.*, 2012).

La tipificación bacteriana es una herramienta que se usa para discriminar entre cepas bacterianas; esto permite estudios filogenéticos, investigación de brotes y la vigilancia de Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Dentro de los métodos de subtipificación que están disponibles para *Salmonella*, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se viene utilizado ampliamente para investigar la ecología de este patógeno en varios puntos a lo largo de la cadena alimentaria. Se han publicado numerosos estudios que emplean esta técnica en vigilancia epidemiológica en *Salmonella* (Paramithiotis *et al.*, 2015).

Desde que fue desarrollada por Schwartz y Cantor en 1984, PFGE, ha demostrado superioridad y poder de permanencia en comparación con otros métodos que se desarrollaron al mismo tiempo. La evaluación de la reproducibilidad, el desarrollo de protocolos estandarizados para el subtipo bacteriano entre laboratorios y la disponibilidad de grandes bases de datos para los patrones de bandas PFGE de patógenos; han aumentado la solidez de los resultados y retienen la permanencia de este método en la tipificación de bacterias (PulseNet, 2017).

Dentro de los estudios de caracterización molecular de *Salmonella* mediante PFGE, tenemos: en 2017, Li y colaboradores reportaron 66 perfiles de PFGE a partir de aislados de *Salmonella* en muestras de carcasa de pollo de engorde; en 2020, Xiong y colaboradores reportaron 19 perfiles de PFGE en aislados de *Salmonella* de origen humano y aviar, con más de 80% de similaridad; y en 2021, Müştak y colaboradores reportaron aislados de origen humano y aviar con similitudes mayores al 99% en el serovar *Enteritidis*. Raseta y colaboradores, en 2015 encontraron aislados de *S. Infantis* con una similaridad del 100% entre aislados de la piel de carcasa de pollo de engorde y humanos infectados.

PFGE permite determinar la relación de casos individuales, detectar, establecer brotes y determinar el vínculo entre la salmonelosis humana y el consumo de alimentos de origen animal (Khaita y Doetkott, 2012). Por ello, el objetivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente los aislados de serovares de SNT provenientes de humanos y productos aviares, aislados en la región de Lima, Perú; para determinar la relación existente entre ellos, mediante porcentajes de similitud por PFGE.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Salmonella*

2.1.1. Características del Género *Salmonella*

Las bacterias del Género *Salmonella* son bacilos gramnegativos de la Familia *Enterobacteriaceae*, son patógenos intracelulares facultativos que pueden colonizar el tracto intestinal de los animales de sangre caliente (homoeotermos) y fría (poiquilotermos), como el hombre, aves, porcinos, bovinos, reptiles, insectos, etc. (Yousef y Carlstrom, 2003; Smith *et al.*, 2018). Son anaerobias facultativas con un tamaño de $0.2-1.5 \times 2.0-5.0 \mu\text{m}$, presentan flagelos peritricos que le dan movimiento, excepto el serovar Gallinarum; no forman esporas, son bacterias negativas a la oxidasa y positivas a la catalasa, y tienen un metabolismo quimiorganotrofo (Yousef y Carlstrom, 2003; Popoff y Le Minor, 2005).

Salmonella tiene la capacidad de crecer y multiplicarse en diversas condiciones ambientales fuera de los hospedadores vivos. La mayoría de los serovares crecen en un rango de temperatura de 5-47 °C; sin embargo, algunos pocos serovares pueden crecer a temperaturas de refrigeración. A menudo, *Salmonella* se elimina a temperaturas de 70 °C o más (Gray y Fedorka-Cray, 2002; Pui *et al.*, 2011).

Salmonella se desarrolla a un pH de 4 a 9, con un rango óptimo entre 6.5 a 7.5, pero, en algunos casos puede crecer a pH bajos (3.5–3.8) como ocurre en los aderezos comerciales para ensaladas y en la mayonesa (Bhunja, 2018). Esta bacteria requiere de una alta actividad de agua

(0.94-0.99) para su supervivencia, pero, pueden sobrevivir con una actividad de agua <0.2 como ocurre en los alimentos secos. (Pui *et al.*, 2011).

Los serovares de *Salmonella* no producen indol, no hidrolizan la urea, no desaminan la fenilalanina o triptófano, reducen fácilmente el nitrato a nitrito, fermentan una variedad de carbohidratos con producción de ácido y son negativos para la reacción de Voges-Proskauer; la mayoría de aislados produce sulfuro de hidrógeno con excepción de *S. enterica* subsp. *arizonae* y subsp. *diarizonae*, además, la mayoría de los serovares utilizan arginina, ornitina y descarboxilan la lisina (Popoff y Le Minor, 2005).

2.1.2. Nomenclatura y clasificación

2.1.2.1. Especies y sub especies de *Salmonella*

La nomenclatura de *Salmonella* ha presentado varios esquemas taxonómicos. En 2005, el Dictamen Judicial 80, dado por el Comité Internacional de Sistemática Procariota, esboza un sistema nomenclatural, donde, se clasifica a *Salmonella* en dos especies, según las diferencias en su análisis de secuencia de ARNr 16S: *Salmonella enterica* (*S. enterica*), como especie tipo, y *Salmonella bongori* (Tindall *et al.* 2005).

El esquema mencionado, es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y ha sido adoptado por la mayoría de los centros de referencia de *Salmonella* en el mundo; incluidos los Centros para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés). Existe una tercera especie denominada *Salmonella subterranea* que fue reconocida en 2005, y los CDC podrían incorporarla en su sistema en un futuro próximo (Su y Chiu, 2007; Rodney, 2013; Eng *et al.*, 2015; Bhunia, 2018). *Salmonella subterranea* se aisló del sedimento del subsuelo de bajo pH, contaminado con nitratos y uranio (Rodney, 2013).

Basada en propiedades bioquímicas y la relación genómica, *S. enterica* se clasifica en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*; que según la nomenclatura se designan con números romanos: I, II, IIIa, IIIb, IV y VI respectivamente. *S. enterica* subsp. *enterica* (la subespecie I) es la más común y se le atribuye aproximadamente el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos, aves y otros animales de sangre caliente (Bhunja, 2018).

2.1.2.2. Esquema Kauffmann-White- Le Minor

El sistema de Kauffmann-White-Le Minor clasifica a *Salmonella* en serovares basado en sus determinantes antigénicos de superficie; así tenemos, al antígeno somático (O) que determina el grupo al que pertenece el aislado de *Salmonella*, el antígeno flagelar (H) que determina al serovar y el antígeno capsular (K) que rara vez se encuentran en la mayoría de los serovares de *Salmonella*; sin embargo, existe un subtipo capsular Vi (antígenos de virulencia) que se encuentra comúnmente en *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* (rara vez) y algunas cepas de *Citrobacter* (Kauffmann, 1941; Brenner *et al.*, 2000; McQuiston *et al.*, 2008).

El antígeno O se encuentra en la membrana celular bacteriana externa y forma el componente oligosacárido del lipopolisacárido (LPS). Los antígenos H corresponden a los flagelos de la bacteria; *Salmonella* posee dos genes que codifican para las proteínas flagelares, es decir, pueden exhibir dos antígenos H distintos (fase 1 y 2). Los serovares de *Salmonella* que expresan un tipo de antígeno H, son monofásicos, y los que expresan dos tipos de antígenos, son difásicos; pero, se cree que los aislados difásicos solo expresan el antígeno H de una fase a la vez. *Salmonella* es única entre las bacterias entéricas respecto a esta característica (McQuiston *et al.*, 2008).

Las fórmulas de los serovares de *Salmonella* están bajo el sistema de Kauffmann-White-Le Minor; por ejemplo, las fórmulas antigénicas para los serovares *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Infantis, según el esquema Kauffmann-White-Le Minor, respectivamente son: (1, 9, 12: g, m: -) y (6, 7, 14: r: 1, 5), donde 1, 9, 12, 6, 7 y 14 son antígenos O; g, m, r son antígenos H de fase 1; y 1, 5 son antígeno H de fase 2. Se puede observar que *S. Enteritidis* es monofásico y *S. Infantis* es difásico (Grimont y Weill, 2007).

Para la primera mención en una publicación, se utiliza el nombre completo "*Salmonella enterica*", seguidamente se nombra la subespecie (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) y por último la palabra "serovar" o la versión abreviada "ser", junto con el nombre del serovar que inicia con una letra mayúscula y sin cursiva (solo para la subespecie I, ya que, para las otras cinco subespecies, los serovares se designan de acuerdo con sus fórmulas antigénicas). Las siguientes menciones del nombre se puede condensar y se nombraría solo como *Salmonella* + el nombre del serovar (Popoff *et al.*, 2004; Guibourdenche *et al.*, 2010; Bhunia, 2018; Smith *et al.*, 2018).

2.1.2.3. Serovares de *Salmonella enterica*

Los términos "serovares" y "serotipos" generalmente se consideran sinónimos, pero, para mantener una uniformidad internacional el término "serovar" es el adecuado (Ryan *et al.*, 2017).

En la última actualización publicada en 2014 (una actualización de 2010), existen 2659 serovares en el género *Salmonella*, de los cuales 2639 pertenecen a *Salmonella enterica* y 20 a *Salmonella bongori*; 1586 serovares pertenecen subespecie *enterica* de *Salmonella* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

Los serovares más relevantes son aquellos que no están restringidos a una única especie, ya que, al pasar de animales a humanos, o viceversa, pueden causar las ETA (Wiedemann *et al.*, 2015). Dentro de los serovares no tifoideos, hay algunos que tienen una preferencia particular por algunas especies animales, por ejemplo; los serovares Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Saintpaul, Virchow, Senftenberg e Infantis se encuentran principalmente en pollos, pavos y patos; los serovares Dublín y Bovis infectan principalmente al ganado, mientras que los serovares Derby y Brandenburg circulan con frecuencia entre los cerdos (Weill, 2008).

Según los CDC, los principales 20 serovares de *S. enterica* que son responsables de la mayoría de los brotes en humanos, en los Estados Unidos (de mayor a menor) incluyen: Enteritidis, Typhimurium, Newport, Javiana, I4,[5],12:i-, Heidelberg, Montevideo, Oranienburg, Saintpaul, Muenchen, Braenderup, Infantis, Thompson, Mississippi, Paratyphi B, Typhi, Agona, Schwarzengrund, Bareilly y Hadar (Bhunia, 2018).

2.1.3. Nicho ecológico

El nicho principal de *Salmonella* es el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, y animales de sangre fría; la mayoría de los cuales son excretores subclínicos. *Salmonella* puede resistir en el medio ambiente (hasta más de nueve meses) y en los alimentos para animales; especialmente en harinas de pescado, sangre y huesos (Markey *et al.*, 2013). Las salmonelas no se originan en otros hábitats como el agua, el medio ambiente y los alimentos; por tanto, su presencia en estos representa contaminación fecal (Abulreesh, 2012).

2.2. SALMONELOSIS EN ANIMALES

2.2.1. Reservorio animal de *Salmonella*

Muchos serovares de *Salmonella* se pueden encontrar en el tracto gastrointestinal de animales de producción, sin causar ningún signo clínico. Estos pueden infectarse a través de la contaminación ambiental, de otros animales, de alimentos y/o fertilizantes preparados a partir de restos de carne y huesos contaminados con *Salmonella*. La infección puede propagarse durante la crianza y el sacrificio de los animales. Dentro de los animales que pueden infectarse con *Salmonella* incluyen ovinos, caprinos, bovinos, porcinos, aves comerciales, otras aves, reptiles, mariscos y anfibios (Cummings *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2012).

En las instalaciones de crianza intensiva, el papel de los portadores es importante, ya que contaminan el medio ambiente y contribuyen a la propagación de *Salmonella* en la granja, creando a veces situaciones endémicas. Muchas especies animales juegan el papel de reservorio, pero, las aves de corral y los cerdos son los reservorios predominantes de *Salmonella*, por ello, no debe subestimarse la importancia de los pollos de engorde y otras aves de granja como diseminadores de esta bacteria (Giaccone *et al.*, 2012).

2.2.2. Salmonelosis en avicultura

La salmonelosis aviar es de importancia en la industria avícola, no solo por el efecto en la salud de las aves; sino también, porque puede causar enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) impactando negativamente en la salud pública, además, de desarrollar resistencia antimicrobiana. Todo esto podría conllevar a restricciones internacionales en la importación y exportación de productos y subproductos aviares con el consecuente impacto económico.(Mead *et al.*, 2010; Pulido, 2019)

Existe una gran variedad de serovares de *Salmonella*, así como diferentes fuentes de infección que dificultan tener un programa de control exitoso en las granjas de aves de corral. Estos programas deben basarse en medidas para reducir las infecciones por serovares importantes para la salud y el rendimiento de las aves (*S. Gallinarum*), la salud pública (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, etc.) y sin olvidar a los serovares emergentes, salvajes o raros (Pulido, 2019).

2.2.2.1. Fuentes de *Salmonella* en avicultura

Las salmonelas pueden entrar en una parvada a través de múltiples fuentes ambientales como: alimento, agua o contacto con otras aves de corral; y permanecer durante largos periodos de tiempo (Gómez *et al.*, 2012). *Salmonella* puede sobrevivir durante 26 meses en alimentos contaminados, en heces de aves infectadas durante más de 11 días, cuando está dentro de los galpones, o durante nueve días en espacios abiertos (Castiglioni *et al.*, 2012).

Las aves silvestres, insectos, roedores, pueden ser portadores de *Salmonella* y pueden transmitir la bacteria a diferentes alimentos (Greenberg y Klowden, 1972). Los serovares de *Salmonella* presentan una buena adaptación a diferentes condiciones ambientales; por ejemplo: *S. Senftenberg* ha sido aislada en ingredientes crudos de alimentos para aves y muestras ambientales recolectadas de granjas, plantas de incubación y fábricas de alimentos, por ello, es reconocida como uno de los serovares más resistentes (Wiedemann *et al.*, 2015; Pulido, 2019).

2.2.2.2. Transmisión

Los serovares de *Salmonella* colonizan casi todas las partes del tracto intestinal del ave, con mayor predilección en los ciegos, para luego excretarse a través de las heces sin que muestren signos clínicos; esto conduce a la transmisión horizontal a otras aves, a la contaminación de las canales en planta de faenamiento, a la contaminación de los huevos con heces y a la transmisión transovárica (De Reu *et al.*, 2006; Gantois *et al.*, 2008).

2.2.2.3. Pullorosis y tifosis aviar

Los serovares adaptados a las aves: *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* se han reportado rara vez en las últimas décadas en países desarrollados, excepto en casos esporádicos de parvadas de aves de corral (Wunderwald y Hoop, 2002). En América Latina y otros países en vías de desarrollo, la enfermedad por estos serovares se continúa reportando (Lee *et al.*, 2013). Las infecciones por *S. Gallinarum* (en aves adultas) y *S. Pullorum* (en aves jóvenes) son responsables de niveles sustanciales de morbilidad e incluso mortalidad. Ambos biotipos son colonizadores de los ciegos, pero, generalmente menos eficientes que la mayoría de los serovares no tifoideos (Setta *et al.*, 2012).

2.2.2.4. Salmonelosis no tifoidea

Las salmonelas no tifoideas (SNT) o paratifoideas son bacterias generalistas, es decir no están especializadas o restringidas a un único hospedador. Generalmente, los serovares de SNT son capaces de colonizar múltiples órganos sin ocasionar signos clínicos evidentes en las aves, sin embargo, provocan la contaminación de la carne y de los huevos. En ciertas circunstancias; según el serovar, las condiciones de cada granja y la inmunosupresión de la aves; pueden repercutir fuertemente en la salud y productividad de estas (Gast, 2013; Pulido, 2019).

Serovares no tifoideos con baja presentación como: *S. Mbandaka*, *S. Urbana*, *S. Agona*, *S. Muenchen*, *S. Braenderup* y *S. Senftenberg*, entre otras; se han aislado de muestras de cama de ave, polvo, heces y botas de arrastre en las granjas (Pulido, 2019). Estos mismos serovares han sido identificadas como causantes de ETA asociadas a diferentes productos de origen animal (Berger *et al.*, 2009; CDC., 2016).

Salmonella *Infantis* se ha identificado como un serovar emergente, con una amplia resistencia a los antimicrobianos (Kehrenberg *et al.*, 2006). Se ha aislado en pollos de engorde, en algunos casos sin causar signos clínicos ni lesiones (Nógrády *et al.*, 2008); sin embargo, también se ha informado que algunas cepas de *S. Infantis* en particular, pueden causar enfermedad en los pollos de engorde mayores de 14 días, con signos clínicos como: depresión, bajo rendimiento y alta mortalidad; además, de lesiones como: poliserositis, hepatomegalia y esplenomegalia (Pulido, 2019).

En 2007, en Corea, Kim y colaboradores evaluaron dos empresas de integración vertical de pollo de engorde, detectando: *S. Enteritidis* en granja de reproductoras; *S. Enteritidis* y *S. Mbandaka* en planta de incubación; *S. Enteritidis* en granja de pollo de engorde y en planta de faenamiento, en una de ellas; mientras que en la otra, encontraron mayor cantidad de serovares (incluyendo emergentes) como: *S. Heidelberg* en granja de reproductoras; *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg* y *S. Enteritidis* en planta de incubación; *S. Senftenberg*, *S. Gallinarum* y *S. Blockley* en granja de pollo de engorde; *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis*, *S. Blockley* y *S. Virchow* en planta de faenamiento.

En Europa; se ha reportado, en la soja cruda proveniente de Brasil, un serovar emergente: *Salmonella* *Yoruba*. (Wiedemann *et al.*, 2015; Pulido, 2019). En Ecuador se encontró una prevalencia de *Salmonella* de 4.3% en una planta de alimentos para pollos. Los serovares encontrados fueron: *Senftenberg*, *Kentucky*, *Koessen*, *Mbandaka* y *Soerenga* (en camiones de alimentos); *Agona*, *Infantis*, *Newport*, *Saintpaul*, *Uganda* y *Anatum* (en ingredientes crudos, alimentos de inicio y crecimiento; y equipos de molienda) (Pulido, 2019).

2.3. SALMONELOSIS EN HUMANOS

2.3.1. Transmisión

El modo más común de transmisión de *Salmonella* es a través de la ruta fecal-oral, cuando se ingieren alimentos derivados de un animal infectado o alimentos contaminados con materia fecal de una persona o animal infectado. Los humanos pueden ser portadores de *S. enterica* en su intestino, por lo general eliminan *Salmonella* en sus heces durante varios meses después del episodio de gastroenteritis donde se convirtió en portador. El humano como portador es de menor importancia que los animales; esto es debido, a que el estado de portador crónico no es común en humanos, pero, si en los animales (Cummings *et al.*, 2012).

2.3.2. Los alimentos como causa de salmonelosis humana

La salmonelosis causa más carga de enfermedad que cualquier otro patógeno transmitido por los alimentos. Estos brotes generalmente son producto de la contaminación de la fuente de producción (granjas de aves, molinos de mezcla de alimentos y/o mataderos) o durante el envasado, distribución y comercialización de alimentos (Gómez *et al.*, 2012). En EE.UU. se han producido grandes brotes en restaurantes, instituciones para niños, hospitales y hogares de ancianos (Cummings *et al.*, 2012).

Entre los alimentos relacionados a la transmisión de *Salmonella*, tenemos a: los huevos crudos, poco cocidos o subproductos del huevo, leche cruda o subproductos lácteos, aves de corral, carne, agua contaminada y cualquier otro alimento contaminado (Cummings *et al.*, 2012). Se conocen más de 2000 serovares de *Salmonella*, pero, solo unos cuantos de estos se asocian con las ETA. Los serovares que causan enfermedades están influenciados por la distribución geográfica del serovar o patogenicidad de la cepa (Gómez *et al.*, 2012).

De acuerdo a la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N° 071-MINSA/DIGESA), debe haber ausencia de *Salmonella* en 25g de carne cruda de ave refrigerada o congelada, y ausencia en 25 g o 25 ml de huevos con cáscara (MINSA, 2008); sin embargo, es un peligro hipotético, ya que se debe ingerir una gran cantidad de *Salmonella* para causar gastroenteritis; aun así, se han informado brotes de salmonelosis transmitidos por alimentos que contenían menos de 100 e incluso menos de 10 UFC/g del producto (Giaccone *et al.*, 2012).

Hay que tener en cuenta que los alimentos contaminados con *Salmonella* generalmente no muestran ninguna modificación en sus características sensoriales a pesar de que los patógenos en su interior hayan alcanzado niveles muy altos, concretamente perjudiciales para la salud humana

(Lindhardt *et al.*, 2009). Los alimentos grasos, protegen a las bacterias de las enzimas digestivas; además, la baja actividad hídrica de estos alimentos, mantiene a las salmonellas en una fase latente, y esto significa que no proliferan, pero pueden sobrevivir durante mucho tiempo (Jasson *et al.*, 2011).

2.3.3. Epidemiología

2.3.3.1. Prevalencia e incidencia

Se desconoce la verdadera incidencia de *Salmonella* asociada a ETA, ya que los brotes pequeños a menudo no se informan (Gómez *et al.*, 2012). La incidencia general de infección por *Salmonella* confirmada por análisis de laboratorio fue de 17.6 casos por cada 100,000 personas en el 2010, en los EE.UU. (CDC, 2011). La salmonelosis causada por cepas no tifoideas de *Salmonella*, es la enfermedad transmitida por los alimentos más común reportada por la vigilancia activa de laboratorio basada en la población de los EE.UU. (Cummings *et al.*, 2012).

En la Unión Europea: *S. Enteritidis* (48.7%), *S. Typhimurium* (12.4%), *S. Typhimurium* monofásico (11.1%), *S. Infantis* (12.4%) y *S. Derby*; son los serovares más importantes en salud pública, de 694 brotes transmitidos por los alimentos en 2020. *S. Enteritidis* se relacionó principalmente con fuentes de pollos de engorde, con ponedoras y huevos (EFSA, 2021).

2.3.3.2. Mortalidad

Si bien el riesgo de muerte por salmonelosis no suele ser común en la población general; este riesgo puede aumentar en grupos vulnerables, especialmente entre los niños pequeños, los adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos (personas con VIH/SIDA, leucemia, cáncer de médula ósea) o trastornos autoinmunes (Cummings *et al.*, 2012). De 1990 a 2007, hubo 1,372 muertes relacionadas con SNT en los EE.UU. La tasa de mortalidad promedio ajustada por edad durante todo el período de estudio fue de 0.028 por 100,000 habitantes. La edad promedio de los fallecidos fue de 63.1 años. (Cummings *et al.*, 2012).

2.3.3.3. Serovares de *Salmonella* en infecciones humanas

S. Typhi y *S. Paratyphi*, son los agentes etiológicos que causan la fiebre tifoidea y paratifoidea, en humanos, respectivamente; estos se reportan aún en países en desarrollo. En los países desarrollados, donde hay una vigilancia activa y coordinada de las ETA, se informan con frecuencia serovares de SNT (Cummings *et al.*, 2012). La enfermedad por serovares de SNT en humanos es autolimitante y desaparece entre cuatro a siete días, pero, tiene efectos secundarios significativos: los pacientes tardan meses en recuperar la función intestinal adecuada y pueden

seguir siendo portadores durante meses. En pacientes inmunodeprimidos podría ocurrir complicaciones crónicas (Castillo *et al.*, 2012).

Dentro de los serovares de SNT, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* han estado involucradas con mayor frecuencia en brotes de salmonelosis (Kottwitz *et al.*, 2010). En Japón, entre 1999 y 2002, el 32% de los casos de infección transmitida por alimentos se debió a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Infantis*, como los serovares predominantes (Castiglioni *et al.*, 2012). En México hubo 709,278 casos de salmonelosis reportados entre 2004 y 2009 (Gómez *et al.*, 2012).

2.4. *Salmonella* COMO PATÓGENO ALIMENTARIO DE ORIGEN ANIMAL

Salmonella es la bacteria patógena más común asociada con una variedad de alimentos, sin embargo, la carne, subproductos cárnicos, aves, subproductos avícolas y los productos lácteos, son las fuentes más importantes de infecciones por *Salmonella* en los humanos. Esta bacteria puede ingresar a la cadena alimentaria: en granjas, piensos, fabricación, procesamiento y venta de alimentos (Gómez *et al.*, 2012). En 2009, investigaciones en la Unión Europea mostraron que *Salmonella* se encontró con mayor frecuencia en carne cruda de pavo (8,7%), pollo (5,4%), cerdo (0,7%) y ganado (0,2%) (EFSA, 2011).

Varios trabajadores manipulan animales durante el sacrificio y el procesamiento; y la contaminación es posible cuando hay *Salmonella* en el equipo, en las manos o en la ropa de los trabajadores (Lo Fo Wong *et al.*, 2002). En los hogares, los alimentos que llegan contaminados y son poco cocidos, pueden contener cepas de *Salmonella* que sobreviven a la mala cocción, y a la vez, pueden contaminar de manera cruzada otros alimentos (Gómez *et al.*, 2012).

2.4.1. *Salmonella* en fuentes avícolas

El mayor número de brotes de *Salmonella* está relacionado con las aves de corral (pollo, pavo, pato y faisanes) como reservorio principal (De Freitas *et al.*, 2010)..

2.4.1.1. *Salmonella* en carcasa de pollo de engorde

La contaminación microbiana endógena de la carcasa de pollo de engorde puede ocurrir a partir del contenido intestinal de aves infectadas, donde la cantidad de *Salmonella* aumenta debido al estrés antes del sacrificio, desde allí se propagan a la sangre y alcanzan los músculos, los linfonódulos y órganos internos; sin embargo, la principal contaminación microbiana es exógena, esta ocurre durante las diversas etapas del sacrificio, corte, procesamiento, incluso en la compra, conservación y preparación de alimentos antes del consumo (Giaccone *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2012).

La etapa de sacrificio que puede conducir a una mayor contaminación por *Salmonella* es la evisceración, donde la liberación de contenido o heces de una o más aves, incluso si es limitada, da como resultado la contaminación de partes de la carcasa, además, de contaminar otras carcasas. Las principales especies animales que pueden albergar *Salmonella* en su intestino, en orden descendente son: aves de corral, cerdos y ganado; donde podemos encontrar de 10^{10} a 10^{12} UFC/ g de contenido intestinal, dependiendo de la especie animal (Giaccone *et al.*, 2012).

2.4.1.2. *Salmonella* en huevos comerciales

Salmonella puede contaminar la cáscara y/o el contenido del huevo, pero, la cáscara es la que con mayor frecuencia se encuentra contaminada en comparación al contenido del huevo. En 2003, el dictamen del Comité Científico Europeo sobre medidas veterinarias relacionadas con la salud pública sobre *Salmonella* en productos alimenticios, indicó, que los huevos y los alimentos producidos con huevos crudos (sin pasteurizar) se encuentran entre las categorías de alimentos con mayor probabilidad de causar casos de salmonelosis humana (Andreoletti *et al.*, 2009).

La contaminación endógena de los huevos ocurre cuando estos se infectan transovaricamente con *Salmonella*, por gallinas enfermas o portadoras. Por otro lado, la contaminación exógena del huevo puede ocurrir: durante el transporte, el envasado o durante el descascarado (Giaccone *et al.*, 2012).

Los factores (defensas naturales) que pueden permitir la infección del huevo, incluyen, factores físicos como: la cutícula, la cáscara, las membranas de la cáscara, la viscosidad de la albúmina y la chalaza; y factores químicos como: el pH de la albúmina, la lisozima, la avidina, la flavoproteína y las moléculas proteicas inhibidoras de la proteasa (Giaccone *et al.*, 2012).

2.5. VIGILANCIA DE SALMONELOSIS TRANSMITIDA POR LOS ALIMENTOS

La Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (FoodNet) administrada por los CDC, recopila datos de vigilancia activa basados en la población, sobre infecciones confirmadas por el laboratorio. Los CDC establecieron la base de datos nacional de *Salmonella* en PulseNet, que es la red nacional de subtipificación para la vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos, para subtipar patógenos bacterianos y así rastrear casos potencialmente no relacionados en áreas geográficas aisladas e identificar cepas de brotes (Cummings *et al.*, 2012).

2.6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Salmonella*

Se necesitan métodos de tipificación confiables y potentes para obtener información sobre las rutas de infección de los microorganismos patógenos. Muchos brotes clínicos se agrupan entre unos pocos serovares, por lo que a menudo se necesita más discriminación; para ello, el serotipado de *Salmonella* puede combinarse con otras técnicas y con ello proporcionar mayor discriminación, que sea reproducible y comparable entre los aislados vinculados epidemiológicamente (Pickard *et al.*, 2008; Imen *et al.*, 2012).

2.6.1. Subtipificación microbiana

La subtipificación microbiana permite determinar si los aislados bacterianos obtenidos de diferentes casos, están relacionados entre sí. Por ejemplo, si se aísla *Salmonella* del mismo subtipo, a la vez, en dos pacientes de un centro de salud en particular; es posible que se hayan infectado a partir de una misma fuente alimentaria o de un paciente a otro, pero, es menos probable que hayan adquirido la infección de fuentes no relacionadas (Sandora *et al.*, 2014).

2.6.2. Esquemas de subtipificación molecular de *Salmonella* asociada a los alimentos

La subtipificación bacteriana es una herramienta que se usa para discriminar entre cepas bacterianas; esto permite estudios filogenéticos, la investigación de brotes y la vigilancia de las ETA. A un inicio, los ensayos de tipificación fueron los fenotípicos, como: la resistencia a los antibióticos, la susceptibilidad a los fagos y la serotipificación. Posteriormente, la tipificación molecular se ha venido usando con mayor frecuencia, ya que los resultados de estos protocolos generalmente son reproducibles debido a la naturaleza estable del ADN, y generalmente son más rápidos y menos laboriosos (Imen *et al.*, 2012).

Un buen método de subtipo debe cumplir cinco características principales: capacidad de tipificar, tener reproducibilidad, tener poder discriminatorio, tener facilidad de realización e interpretación (Van Belkum *et al.*, 2007). Los esquemas de tipificación genotípicos que se han utilizado para *Salmonella* pueden clasificarse según el tipo de datos que se comparan, así tenemos: los análisis basados en perfiles y análisis basados en secuencias (Paramithiotis *et al.*, 2015).

La ribotipificación, el análisis de perfiles de plásmidos, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y el análisis repetido en tándem de número variable de multilocus (MLVA) se basan en análisis de perfiles; mientras que la tipificación de secuencia de multilocus (MLST), el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP), el análisis de la secuencia del genoma completo (WGS) y el análisis de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente

interesenciadas (CRISPR) se basan en análisis de secuencias (Paramithiotis *et al.*, 2015). En el cuadro 1 se resume algunos métodos de subtipificación de *Salmonella*

Dentro de los métodos de subtipificación que se han utilizado para *Salmonella*, la técnica de PFGE se ha utilizado ampliamente para investigar la ecología de este patógeno, en varios puntos a lo largo de la cadena alimentaria, como: la relación genética de los aislados de humanos, animales y del medio ambiente. Se han publicado numerosos estudios que emplean esta técnica en vigilancia epidemiológica de *Salmonella* (Paramithiotis *et al.*, 2015). En los EE.UU., la red de subtipificación molecular para enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos, utiliza la técnica PFGE estandarizada (Khaita y Doetkott, 2012).

2.6.3. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Desde que fue desarrollada por Schwartz y Cantor en 1984, PFGE, ha demostrado superioridad y poder de permanencia en comparación con otros métodos que se desarrollaron al mismo tiempo. La evaluación de la reproducibilidad, el desarrollo de protocolos estandarizados para el subtipo bacteriano entre laboratorios y la disponibilidad de grandes bases de datos para los patrones de bandas de patógenos PFGE; han aumentado la solidez de los resultados y retienen la permanencia de este método en la tipificación de bacterias (PulseNet, 2017).

2.6.3.1. Definición y fundamento

Todos los métodos moleculares de primera a tercera generación requieren el uso de electroforesis en gel de agarosa para separar un plásmido en fragmentos de ADN. A partir de estos fragmentos o bandas de ADN se establecen patrones que permiten una asignación clonal a las bacterias. Como una innovación, se agregó la reorientación del campo eléctrico, en los métodos de tercera generación, como PFGE (Goering, 2010).

Los principios de separación de ADN por PFGE se basan en la reorientación periódica pulsátil de dos campos eléctricos y la capacidad de las moléculas de ADN de reorientarse en la nueva dirección de aplicación de dichos campos eléctricos en un gel de agarosa. De esta manera se obtendrán patrones de bandas PFGE llamados pulsotipos (Dunnen y Van Ommen, 1993; Maule, 1998; Goering, 2010). El tiempo que consumen los fragmentos restringidos de ADN en reorientarse depende de sus tamaños. Las moléculas más pequeñas se reorientan más rápido que las más grandes, y así, se separan una de las otras (Lopez *et al.*, 2019).

Como los genomas bacterianos tienen un tamaño de 2 a 4 Mbp, la electroforesis pulsada permite una separación más clara de fragmentos de ADN de varios tamaños (de kb a Mb), lo que resulta en una mejor tipificación y asignación clonal de las bacterias testadas. Debido a su poder

discriminatorio superior en la tipificación bacteriana, varios laboratorios PFGE han desarrollado protocolos para varios patógenos clínicos (Lopez *et al.*, 2019; Neoh *et al.*, 2019).

2.6.3.2. Componentes y procedimiento

Dependiendo del tiempo de pulso y la orientación del campo electroforético hay variaciones en la técnica de PFGE. Muchos laboratorios en el mundo usan comúnmente la separación de ADN por la electroforesis homogénea de campo eléctrico de contornos limitados (CHEF) que es la más discriminatoria entre las plataformas PFGE debido a que genera pistas de migración rectas, lo que facilita la comparación entre los carriles de gel y, en consecuencia, entre las diferentes muestras (Chu *et al.*, 1986; Lopez *et al.*, 2019).

Los componentes en un sistema de PFGE típico consisten en: una unidad de fuente de alimentación con funciones de conmutación, una cámara de electroforesis, un módulo de enfriamiento y un sistema de documentación en gel que permita visualizar los resultados (Basim y Basim, 2001; Neoh *et al.*, 2019).

Se han publicado protocolos estandarizados de PFGE para estudios de epidemiología molecular, con respecto a diferentes especies y géneros bacterianos (Ribot *et al.*, 2006; PulseNet, 2017); además, la adopción, en 2005, de una cepa universal como tamaño estándar: *Salmonella* Braenderup (H9812), ha sido una práctica extendida principalmente en los laboratorios PulseNet y ha facilitado la configuración de los experimentos y la reproducibilidad de los resultados en diferentes laboratorios (Hunter *et al.*, 2005).

Para el análisis PFGE, se requiere el aislamiento del ADN intacto. Esto se garantiza inmovilizando las células en tapones de agarosa (plugs) y luego lisando y desproteinizando el ADN *in situ* (Dunnen y Van Ommen, 1993). Los protocolos difieren principalmente en los métodos para la lisis de células bacterianas, la selección de la enzima de restricción y los parámetros de cambio y tiempo de funcionamiento durante la electroforesis (Chang *et al.*, 2013).

El ADN bacteriano, inmovilizado en tapones de agarosa, se corta en fragmentos, con enzimas de restricción de corte de baja frecuencia. Los protocolos establecidos publicados en los sitios web de PulseNet International y CDC, usan enzimas de restricción designadas para bacterias específicas, esto permite la comparación de pulsotipos entre diferentes laboratorios y la identificación de cepas bacterianas asociadas con las ETA (Chang *et al.*, 2013; Neoh *et al.*, 2019).

Después de la electroforesis, el gel se tiñe con un agente de intercalación fluorescente para su visualización. Por último, la imagen fluorescente de los patrones de banda de ADN se digitaliza y se analiza mediante inspección visual o mediante software (Lopez *et al.*, 2019).

Para la representación numérica se utiliza un software de análisis de gel (como: GelCompar, BioImage o BioNumerics), este asigna cepas de acuerdo con su incremento en la diferencia de bandas, utilizando coeficientes de similitud (Dice, Jaccard o Pearson) para construir dendrogramas a través de algoritmos, como: el método de grupos de pares no ponderados con promedio aritmético (UPGMA) o el método de unión de vecinos (NJ) (McDougal *et al.*, 2003; Félix *et al.*, 2015). El protocolo que figura en los Métodos PulseNet de los CDC cita al software BioNumerics para su análisis PFGE (Neoh *et al.*, 2019).

2.6.3.3. Interpretación de resultados

PFGE genera y resuelve fragmentos de ADN de macrorestricción en un patrón de bandas que contiene todo el genoma de la muestra analizada. Los patrones de estas bandas se considera la huella genómica de cada aislado bacteriano y lo representa inequívocamente, y así se determina una asignación clonal bacteriana a las muestras analizadas (Goering *et al.*, 2011).

Los criterios de Tenover, se utilizan para la interpretación de los patrones de bandas PFGE. De acuerdo a ellos, se puede determinar el número de eventos genéticos ocurridos y la relación epidemiológica entre dos aislados, según el número de bandas diferentes. Si existe una diferencia de 2-3 bandas, los aislados están "estrechamente relacionados" y de 4-6 bandas son "posiblemente relacionadas"; en estas situaciones se han producido uno o dos eventos genéticos. Si existe una diferencia de siete o más bandas, se considera que se han producido al menos tres eventos genéticos, y el aislamiento no es parte del brote (Tenover *et al.*, 1995, 1997).

El uso de un software especializado para digitalizar las imágenes del gel, detectan automáticamente la posición de las bandas, las comparan estadísticamente utilizando medidas de distancia matemáticas, y en base a ello construyen dendrogramas para agrupar las huellas de ADN bacteriano en subtipos específicos, los resultados son similares a los obtenidos por los criterios de Tenover (Carriço *et al.*, 2005; Tseng y Lee, 2015); sin embargo, el uso de software permite la transferencia de información intra e interlaboratorio, además de simplificar y reducir el sesgo en el análisis e interpretación (Gerner-Smidt *et al.*, 1998; Garaizar *et al.*, 2000; Rementeria *et al.*, 2001; Yokoyama y Uchimura, 2006).

Cuadro 1. Resumen de los métodos de subtipificación de *Salmonella* (Tang *et al.*, 2019)

Método	Capacidad de discriminar aislados	Tiempo en obtener resultados (por una colonia)	Tiempo para obtener resultados de los laboratorios comerciales	Importancia para la industria alimentaria	Costo del servicio por aislado (laboratorios comerciales) ¹
Serotipificación clásica de White-Kauffman	Discriminación de subtipos muy deficiente; solo es útil como método de subtipificación para serovares raros e inusuales.	2 a 17 días (generalmente >5 días)	2 a 4 semanas	Es probable que la serotipificación clásica sea reemplazada rápidamente por la predicción de serovares basada en la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés).	\$175.00
Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	Buena discriminación de subtipos para la mayoría de los serovares.	4 a 6 días	2 a 3 semanas	Ha sido el método de subtipificación estándar de oro para <i>Salmonella</i> , y es probable que sea reemplazado por WGS, empezando por las autoridades de salud pública y los reguladores de alimentos.	\$130.00 – 200.00
Análisis de número variable de repeticiones en tándem (VNTR) de múltiples locus (MLVA)	Buena discriminación de subtipos para la mayoría de los serovares. Puede tener un mejor rendimiento que la PFGE para algunos serovares, pero peor para otros.	1 a 2 días	No disponible	Se ha utilizado como método de subtipificación secundaria para compensar el bajo poder discriminatorio de la serotipificación y la PFGE para algunos serovares de <i>Salmonella</i> ; es probable que sea reemplazado rápidamente por la WGS, empezando por las autoridades de salud pública y los reguladores de alimentos.	No disponible

Cuadro 1. Resumen de los métodos de subtipificación de *Salmonella* (continuación) (Tang *et al.*, 2019)

Método	Capacidad de discriminar aislados	Tiempo en obtener resultados (por una colonia)	Tiempo para obtener resultados de los laboratorios comerciales	Importancia para la industria alimentaria	Costo del servicio por aislado (laboratorios comerciales) ¹
Tipificación de secuencias multilocus (MLST)	Mejor que la serotipificación y riboimpresión convencionales, pero peor que PFGE y WGS.	1 a 2 días	2 a 3 días	Permite una confirmación rápida y una detección de subtipos; se puede utilizar para seleccionar el genoma de referencia para el análisis de datos de WGS.	\$280.00
Secuenciación del genoma completo (WGS)	La mejor discriminación entre los métodos de subtipificación molecular	3 a 17 días (depende de las capacidades de secuenciación. Generalmente 1 día después de que finaliza la secuenciación).	2 a 8 semanas	Para las empresas con una gran demanda de aislamientos para subtipificar, la WGS es probablemente el método más asequible y rápido, que proporciona la mejor discriminación. Para las empresas con baja demanda, los costos de la secuenciación en tiempo real pueden ser muy altos, lo que requiere que los aislamientos antiguos deban esperar hasta que se recopilen más aislamientos para enviarlos juntos.	\$100.00 (usando la serie Illumina HiSeq X)—hasta más de \$500 (usando Illumina MiSeq)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

La reactivación de los aislados de serovares de *Salmonella* de origen aviar se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria Sección Bacteriología (LMPV-SB) de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). La reactivación de los aislados de serovares de *Salmonella* de casos clínicos humanos, así como la caracterización molecular de aislados aviares y humanos se llevó a cabo en el Laboratorio de Enteropatógenos y Laboratorio de Zoonosis bacterianas del Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima, Perú.

3.2. Muestras

Se trabajaron un total de 49 aislados de serovares de *Salmonella enterica* no tifoidea (SNT) obtenidos entre los años 2012-2017 provenientes del departamento de Lima. Se incluyeron aislados de serovares de SNT de casos clínicos humanos (18) y de origen aviar (31). Todos los aislados mencionados fueron previamente confirmados por PCR del gen *InvA* de *Salmonella* sp.

Los aislados de *Salmonella* de origen humano fueron proporcionados por el INS; y se obtuvieron a partir de muestras de heces de pacientes con diarrea, estas fueron procesadas en los

centros de salud y derivadas posteriormente al INS para su tipificación; es aquí, donde se seleccionaron a partir del registro del cepario mediante números al azar, 18 aislados de serovares de SNT. Estos habían sido serotipificados anteriormente con antisueros somáticos y flagelares específicos mediante el esquema de Kauffmann White Le Minor (Ver cuadro 2).

Los aislados de *Salmonella* de origen aviar son provenientes del cepario correspondiente a los casos que ingresaron al Laboratorio de Microbiología Sección Bacteriología de la FMV-UNMSM. Las muestras, de donde se obtuvieron los aislados, fueron tomadas y enviadas por los clientes para el servicio de laboratorio. Entre estas muestras tenemos: vísceras (casos clínicos), carcasas de pollo de engorde y huevos comerciales (de mercados), hisopados de cloaca y cama de ave (de granjas de crianza) (Ver cuadro 3). Se incluyeron todos los aislados (31) de serovares de SNT que habían sido serotipificados anteriormente con antisueros somáticos y flagelares específicos mediante el esquema de Kauffmann White Le Minor en el INS.

Cuadro 2. Lista de aislados criopreservados de los serovares de SNT de pacientes humanos con diarrea, obtenidos durante el periodo 2012-2017 en el departamento de Lima

	Identificación del aislado	Muestra de origen	Fórmula antigénica Esquema Kauffmann White Le Minor	Serovar <i>Salmonella</i>
1	H1	Heces humanas	1,4,[5],12: i:1,2	S. Typhimurium
2	H2	Heces humanas	8,20:i:z6	S. Kentucky
3	H3	Heces humanas	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
4	H4	Heces humanas	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
5	H5	Heces humanas	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
6	H6	Heces humanas	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
7	H7	Heces humanas	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
8	H8	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
9	H9	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
10	H10	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
11	H11	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
12	H12	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
13	H13	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
14	H14	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
15	H15	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
16	H16	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
17	H17	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
18	H18	Heces humanas	6,7,14:r:1,5	S. Infantis

Cuadro 3. Lista de aislados criopreservados de los serovares de SNT de origen aviar, obtenidos durante el periodo 2012-2017 en el departamento de Lima

Identificación del aislado		Muestra de origen	Fórmula antigénica Esquema Kauffmann White Le Minor	Serovar <i>Salmonella</i>
1	A1	Vísceras (ponedora comercial)	1,4,[5],12: i:1,2	S. Typhimurium
2	A2	Folículo ovárico (ponedora comercial)	1,4,[5],12: i:1,2	S. Typhimurium
3	A3	Huevos comerciales (cáscara)	1,4,[5],12: i:1,2	S. Typhimurium
4	A4	Carcasa (pollo de engorde)	1,4,[5],12: i:1,2	S. Typhimurium
5	A5	Hisopado cloacal (pollo de engorde)	1,9,12:g,m:-	S. Typhimurium
6	A6	Hisopado cloacal (pollo de engorde)	1,9,12:g,m:-	S. Typhimurium
7	A7	Cama de ave (pollo de engorde)	8,20:i:z6	S. Kentucky
8	A8	Hisopado cloacal (pollo de engorde)	8,20:i:z6	S. Kentucky
9	A9	Hisopado cloacal (pollo de engorde)	8,20:i:z6	S. Kentucky
10	A10	Cama de ave (ponedora comercial)	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
11	A11	Huevos comerciales (contenido)	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
12	A12	Huevos comerciales (contenido)	1,9,12:g,m:-	S. Enteritidis
13	A13	Vísceras (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
14	A14	Carcasa (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
15	A15	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
16	A16	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis

17	A17	Folículo ovárico (ponedora comercial)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
18	A18	Carcasa (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
19	A19	Carcasa (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
20	A20	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
21	A21	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
22	A22	Vísceras (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
23	A23	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
24	A24	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
25	A25	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
26	A26	Carcasa (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
27	A27	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
28	A28	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
29	A29	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
30	A30	Carcasa (pollo de engorde)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis
31	A31	Huevo comercial (cáscara)	6,7,14:r:1,5	S. Infantis

3.3. Reactivación de aislados de *Salmonella*

La reactivación de los aislados criopreservados de *Salmonella* de origen aviar y humano se realizó de acuerdo al protocolo del LMPV-SB de la FMV-UNMSM y del Laboratorio de Enteropatógenos del INS, respectivamente. Para ello, se tomó una asada (10 µl aprox.) del criopreservado (previamente atemperado a 25°C aprox.) y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 3 ml de caldo tripticasa de soya (TSB) (Merck Millipore, USA), el cual fue incubado a 37°C por 18 horas.

Posteriormente, se sembró por agotamiento a partir del caldo incubado, una asada en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Agar XLD) (Merck Millipore, USA) e incubado a 37°C por 24 horas. Pasado dicho tiempo, se observaron las colonias características y se sembraron en un vial de 2 ml de Agar Tripticasa de Soya (TSA) (Merck Millipore, USA) en pico de flauta y se incubó a 37°C por 18 horas; para finalmente ser enviado al Laboratorio de Zoonosis bacterianas del INS para la evaluación molecular.

3.4. Subtipificación molecular por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Para realizar la subtipificación de los aislados de *Salmonella* de origen aviar y humano se utilizó el protocolo de PFGE del Laboratorio de Zoonosis bacterianas del INS, el cual está basado en el procedimiento de PulseNet (ver Anexo A5) (PulseNet, 2013), el cual se describe a continuación, de esta manera se asegura la comparabilidad de resultados entre laboratorios.

3.4.1. Preparación de la muestra

Día 0: A partir de los viales con los aislados de *Salmonella*, se tomó un inóculo y se cultivó en TSB (Merck Millipore, USA), incubándolo a 37°C por 6 horas. Posteriormente, se tomó una asada y se estrió en una placa petri estéril con TSA y se colocó en incubación a 37°C por 18 horas; esto con el objetivo de obtener una mayor cantidad de colonias aisladas. Como control se utilizó *Salmonella* Braenderup H9812 (ATCC, EE.UU.), esta cepa pasó por el mismo procedimiento mencionado.

3.4.2. Preparación de la suspensión celular

Día 1: Se tomaron, con un hisopo estéril humedecido con buffer de suspensión celular (BSC) (Tris 1M, EDTA 0.5M, agua estéril; ver anexo A1), colonias aisladas de las placas de TSA incubadas; para luego ser colocadas en tubos estériles con 3 ml de BSC, así las bacterias quedan suspendidas. Posteriormente se ajustó la concentración de cada suspensión celular, incluyendo la de la bacteria control, en un espectrofotómetro (MicroDigital Co., Ltd, Corea) a una densidad óptica (DO) entre 0.8 – 1.0 con una longitud de onda de 610 nm.

3.4.3. Preparación de Plugs de agarosa

Día 1: Se transfirió 100 µl de las suspensiones celulares de cada muestra y del control a tubos de microcentrifuga estériles de 1.5 ml; estos se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, se adicionó 5 µl de proteinasa K (Millipore Sigma, EE.UU.) y se homogenizó suavemente con una punta de micropipeta. Luego se agregó 100 µl de agarosa SeaKem® Gold (Bio-Rad, EE.UU.) en cada uno de los tubos y se homogenizó con un pipeteo suave. Por último, se distribuyó esta mezcla en los pocillos de un molde para plugs y se dejó que la mezcla solidifique a 25°C por 5 minutos.

3.4.4. Lisis celular en Plugs de agarosa

Día 1: Se preparó la cantidad suficiente de Buffer de lisis celular (BLC) (Tris 50mM, EDTA 50mM, Sarcosil 1% + 0.1 mg/ml de proteinasa K; ver anexo A2), el cual se repartió en 5 ml, en tubos estériles de fondo cónico de 50 ml; luego se adicionó a cada tubo 25 µl de proteinasa

K. Posteriormente, se transfirieron los plugs a los tubos mencionados y se incubaron en baño María a 54°C por 2 horas, con agitación constante de 200 rpm.

3.4.5. Lavado de Plugs de agarosa

Día 1: Se retiraron los tubos del baño María y se decantó el BLC en su totalidad. Seguidamente se adicionó 15 ml de agua de grado molecular (Millipore Sigma, EE.UU.) precalentada a cada uno de los tubos y se volvió a colocar en Baño María a 54 °C por 10 a 15 min (se repitió este paso 2 veces). Posteriormente, se eliminó el agua y se realizó un siguiente lavado con buffer Tris EDTA (TE) estéril (Tris 1M, EDTA 0.5M; ver anexo A3) a 54°C por 10 a 15 min (se repitió este paso 6 veces). Por último, se guardaron los plugs en buffer TE estéril a 4°C hasta que se realizó la digestión del DNA en el siguiente paso.

3.4.6. Digestión del ADN con enzima de restricción *XbaI*

Día 2: Se retiraron los plugs del buffer TE con una espátula y se colocaron en una placa petri estéril. Luego con la ayuda de un bisturí, se cortaron porciones de 2 a 2.5 mm de espesor de los plugs y se transfirieron a tubos de microcentrifuga estériles de 1.5 ml, que contenían el master mix de la enzima de restricción *XbaI* (200 µl/plug) (Promega, EE.UU.), el cual fue preparado de acuerdo a lo indicado en el cuadro 4; los tubos estuvieron debidamente rotulados para cada muestra, incluyendo el control *S. Braenderup* H9812.

Los tubos de microcentrifuga que contenían los plugs con el mix de la enzima de restricción *XbaI* se homogenizaron suavemente por inversión, asegurándose que los plugs quedaran sumergidos en el master mix. Seguidamente, se incubaron a 37 °C por 6 horas. El resto de plugs sobrantes de cada corte se almacenaron a 4°C en crioviales estériles de 2 ml, con 1.5 ml de buffer TE.

Cuadro 4. Preparación del Master Mix para la enzima de restricción *XbaI*

Reactivo	µl/plug (1x)	µl/ 10 plug (10x)
Agua estéril cal. Mol.	175	1750
Buffer de enzima <i>XbaI</i>	20	200
<i>XbaI</i> (10U/µl)	5	50
Volumen total	200	2000

3.4.7. Separación de fragmentos de ADN mediante Electroforesis de Campo Pulsado

Día 2: Se retiraron los plugs del baño María y se eliminó la mezcla de enzima/buffer. Seguidamente, se adicionó 200 µl de buffer Tris-Borato EDTA (TBE) 0.5X (Tris Base 0.9M, Ác. Bórico 0.9M, EDTA 0.5M, agua estéril; ver anexo A4) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Pasado este tiempo, se retiraron los plugs de los tubos y se colocaron en la parte inferior de los dientes del peine, en los carriles correspondientes; se ubicaron también las cepas control y el marcador de peso molecular. Como marcador se utilizó el Ladder lambda PFG (48.5-1018.5kb) (Promega, EE.UU.). Posteriormente se colocó el peine en el molde del gel verificando que los plugs estén alineados.

Para la electroforesis en campo pulsado se utilizó la agarosa SeaKem Gold al 1% junto con buffer TBE 0.5X. El proceso se llevó a cabo en el sistema CHEF Mapper XA System (Bio-Rad, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: pulso inicial de 2.16 s., pulso final de 63.8s, voltaje de 6V/cm, un ángulo de 120° y 14°C; y con un tiempo de corrida de 18 horas.

3.4.8. Tinción y documentación del gel de agarosa

Día 3: Terminada la corrida, el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) por 15 min, para luego ser lavado con agua destilada por 30 min. Se realizó la captura de las imágenes con el Sistema de Documentación Chemidoc XRS (Bio-Rad, EE.UU.).

3.5. Análisis de la información

Las imágenes del gel fueron analizadas mediante el programa Bionumerics V7.0. (Applied Maths, Bélgica). Este generó un dendrograma (árbol de similaridad, mediante coeficiente de similitud de Dice) que muestra la relación XbaI – perfiles PFGE para las salmonelas en estudio. El análisis de las bandas fue mediante el uso del método de UPGM (Unweighted Pair Method with Arithmetic Averages).

Los patrones de PFGE se analizaron por separado según el serovar de *Salmonella*. Los dendrogramas se construyeron para *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Infantis de casos clínicos humanos y de origen aviar. Para agrupar la similitud de los patrones de PFGE (pulsotipos) se utilizó el valor de corte de 90% para indicar que existe relación entre los aislados (Tenover *et al.*, 1995; Hadžiabdić *et al.*, 2015).

IV. RESULTADOS

4.1. Perfiles de PFGE de *Salmonella* Typhimurium

Los análisis de restricción realizados con la enzima XbaI distribuyeron los siete aislados de *Salmonella* Typhimurium en cinco patrones PFGE o pulsotipos, con un porcentaje mayor o igual a 90% de similaridad: Typ1, Typ2, Typ3, Typ4 y Typ5 (ver figura 1). Los pulsotipos Typ1, Typ2, Typ3 y Typ5; son todos de origen aviar y están representados por un único aislado cada uno: A1, A2, A3 y A6, respectivamente. El patrón Typ4 contiene salmonelas de origen humano y aviar; y está representado por 3 aislados de *Salmonella*: A4, H1 y A5.

Los aislados A4 (carcasa de pollo) y H1 (caso clínico humano) son indistinguibles (similaridad del 100%), estos a su vez están relacionados con el aislado A5 (hisopado cloacal) con quien tienen una similaridad del 96%. En el cuadro 5 se resume los pulsotipos encontrados para *S. Typhimurium* indicando su origen y año de aislamiento.

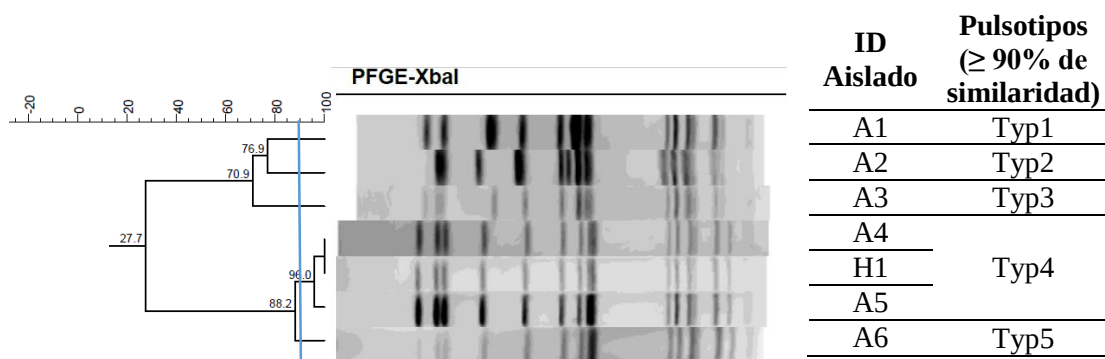


Figura 1. Análisis de PFGE de aislados de *Salmonella* Typhimurium obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.

Cuadro 5. Pulsotipos de *Salmonella* Typhimurium según su origen y año de aislamiento

ID aislado	Año de aislamiento	Origen del aislado	Perfiles PFGE (pulsotipos) (≥ 90% de similitud)
A1	2015	Vísceras (ponedora)	Typ1
A2	2012	Folículo ovárico	Typ2
A3	2017	Cáscara de huevo	Typ3
A4	2012	Carcasa de pollo	Typ4
H1	2012	Heces humanas	
A5	2013	Hisopado de cloaca	Typ5
A6	2012	Hisopado de cloaca	

4.2. Perfiles de PFGE de *Salmonella* Kentucky

En la figura 2, se observan los resultados de los análisis de restricción realizados con la enzima XbaI, donde los cuatro aislados de *S. Kentucky* se distribuyen en tres pulsotipos: Ken1, Ken2 y Ken3; con un porcentaje mayor o igual a 90% de similitud (ver figura 2). Los pulsotipos Ken1 y Ken2 (de origen aviar) están representados por un único aislado cada uno: A7 y A8 respectivamente. El pulsotipo Ken3 contiene salmonelas de origen humano y aviar; y están representados por dos aislados de *Salmonella*: A9 y H2.

Los aislados A9 (Hisopado cloacal) y H2 (caso clínico humano) están relacionados con una similitud del 92.9%. A su vez el aislado de origen humano H2, no se encuentra relacionado con los aislados aviares A7 y A8; con quienes tiene un porcentaje de similitud del 83.2%. En el cuadro 6 se resume los pulsotipos encontrados para *Salmonella* Kentucky indicando su origen y año de aislamiento.

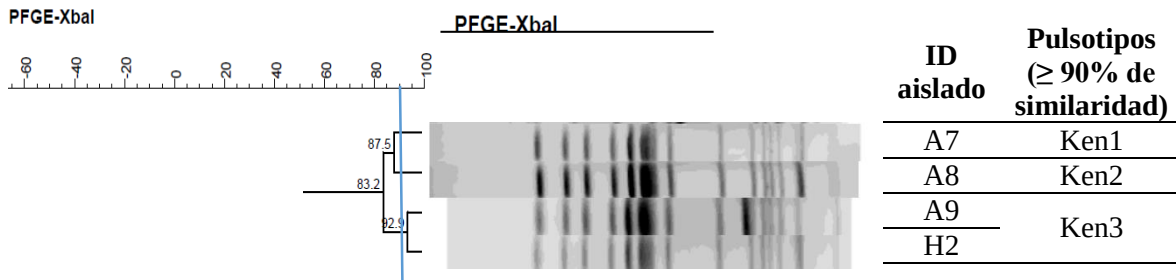


Figura 2. Análisis de PFGE de aislados de *Salmonella* Kentucky obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.

Cuadro 6. Pulsotipos de *Salmonella* Kentucky según su origen y año de aislamiento

ID aislado	Año de aislamiento	Origen del aislado	Perfiles PFGE (pulsotipos) ($\geq 90\%$ de similitud)
A7	2012	Cama de ave	Ken1
A8	2012	Hisopado cloacal	Ken2
A9	2017	Hisopado cloacal	Ken3
H2	2017	Heces humanas	

4.3. Perfiles de PFGE de *Salmonella* Enteritidis

Los análisis de restricción realizados con la enzima XbaI distribuyeron los 8 aislados de *S. Enteritidis* en cuatro pulsotipos: Ent1, Ent2, Ent3 y Ent4; con un porcentaje mayor o igual a 90% de similitud (ver figura 3). Los pulsotipos Ent1 (de origen aviar) y Ent3 (de origen humano) están representados por dos aislados cada uno: A10, A11 y H3, H4 respectivamente. El pulsotipo Ent4 contiene solo salmonelas de origen humano y está representado por tres aislados de *Salmonella*: H5, H6 y H7; estos tres son indistinguibles (similitud del 100%). Por último, el pulsotipo Ent2 está representado por un único aislado de origen aviar: A12.

Los pulsotipos de *S. Enteritidis* de origen aviar presentan una similitud entre 87.8 y 96%. Mientras que los pulsotipos de *S. Enteritidis* de origen humano están relacionados con una similitud de 96.3 a 100 %. No se observa una relación entre los pulsotipos de *S. Enteritidis* de origen humano con los de origen aviar. Los pulsotipos Ent3 y Ent4, de origen humano, presentan una similitud de apenas del 68.5% con los pulsotipos Ent1 y Ent2, de origen aviar. En el cuadro 7 se resume los pulsotipos encontrados para *S. Enteritidis* indicando su origen y año de aislamiento.

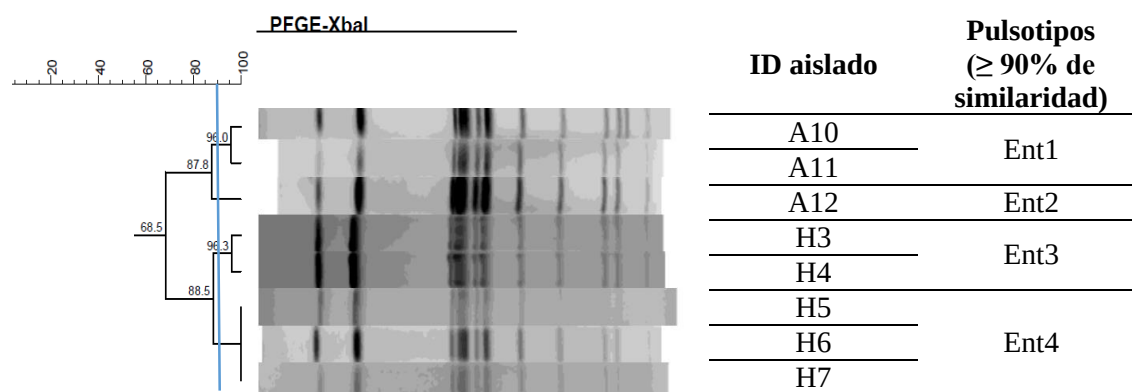


Figura 3. Análisis de PFGE de aislados de *Salmonella* Enteritidis obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.

Cuadro 7. Pulsotipos de *Salmonella* Enteritidis según su origen y año de aislamiento

ID aislado	Año de aislamiento	Origen del aislado	Perfiles PFGE (pulsotipos) ($\geq 90\%$ de similitud)
A10	2012	Cama de ave	Ent1
A11	2017	Yema de huevo	
A12	2017	Yema de huevo	
H3	2012	Heces humanas	Ent3
H4	2012	Heces humanas	
H5	2015	Heces humanas	Ent4
H6	2012	Heces humanas	
H7	2012	Heces humanas	

4.4. Perfiles de PFGE de *Salmonella* Infantis

Los análisis de restricción realizados con la enzima *Xba*I distribuyeron los 30 aislados de *Salmonella* Infantis en nueve pulsotipos: Inf1-Inf9; con un porcentaje mayor o igual a 90% de similitud (ver figura 4).

El pulsotipo Inf1 es de origen aviar y está representado por cinco aislados: A13-A17, siendo los aislados A13 y A14, indistinguibles; al igual que los aislados A15, A16 y A17, que tienen una similitud del 100%. El pulsotipo Inf3 es de origen aviar y están representados por tres aislados: A20, A21 y A22; siendo estos tres indistinguibles (similitud del 100%). Los pulsotipos Inf6 e Inf7 son de origen aviar y están representados por dos aislados (A28 y A29) y un aislado (A30) respectivamente.

El pulsotipo Inf2 está representado por cuatro aislados: H8 y H9 (de origen humano), A18 y A19 (de origen aviar); siendo los aislados H18 (caso clínico humano) y A18 (carcasa de pollo de

engorde) idénticos; estos a su vez están relacionados con el aislado A19 (carcasa de pollo de engorde) con una similaridad del 96%; además, están relacionados con el aislado H9 (caso clínico humano) con una similaridad del 94.9%.

El pulsotipo Inf4 está representado por cuatro aislados: H10 (de origen humano), A23, A24 y A25 (de origen aviar). Siendo los aislados H10 (caso clínico humano) y A23 (cáscara de huevo) indistinguibles (similaridad del 100%), estos a su vez están relacionados con el aislado A24 y A25 (ambos aislados de cáscara de huevo) con una similaridad del 96.2% y 95.3% respectivamente.

El pulsotipo Inf5 está representado por cuatro aislados: H11 y H12 (de origen humano), A26 y A27 (de origen aviar), siendo los aislados H11 (caso clínico humano), A26 (carcasa de pollo) y A27 (cáscara de huevo) idénticos (similaridad del 100%); estos a su vez, están relacionados con el aislado H12 (caso clínico humano) con quien tienen una similaridad del 95.5%.

El pulsotipo Inf8 está representado por tres aislados: H13 y H14 (de origen humano), y A31 (de origen aviar), siendo los aislados humanos H13 y H14 idénticos (similaridad del 100%); estos a su vez están relacionados con el aislado A31 (cáscara de huevo) con una similaridad del 93.1%. El pulsotipo Inf9 es de origen humano y está representado por cuatro aislados: H15-H18, encontrándose aislados indistinguibles (similaridad del 100%): H15 con H16 y H17 con H18. En el cuadro 8 se resume los pulsotipos encontrados para *S. Infantis* indicando su origen y año de aislamiento.

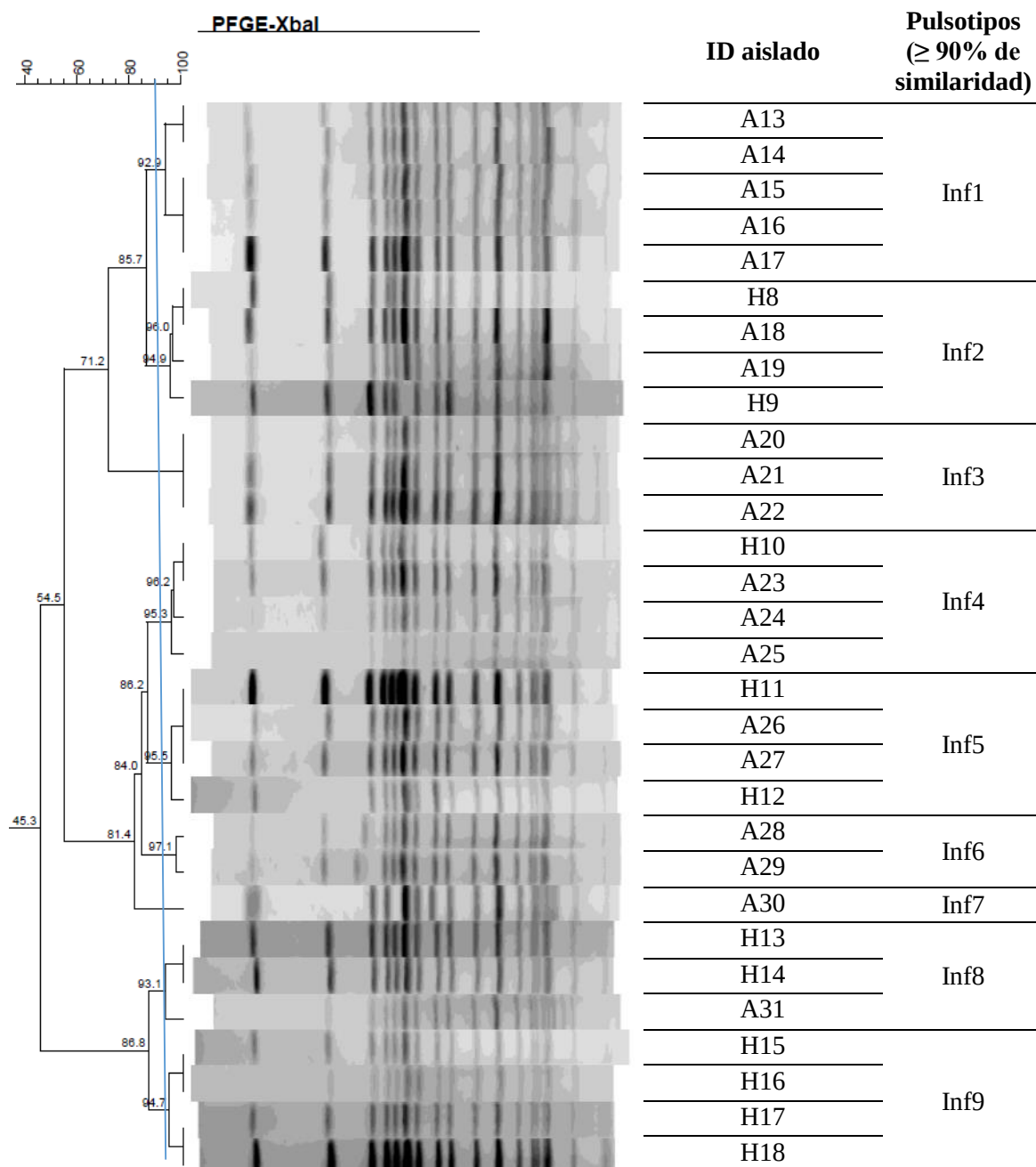


Figura 4. Análisis de PFGE de aislados de *Salmonella* Infantis obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas.

Cuadro 8. Pulsotipos de *Salmonella* Infantis según su origen y año de aislamiento

ID aislado	Año de aislamiento	Origen del aislado	Perfiles PFGE (pulsotipos) ($\geq 90\%$ de similitud)
A13	2017	Vísceras (pollo)	Inf1
A14	2017	Carcasa pollo	
A15	2017	Cáscara de huevo	
A16	2017	Cáscara de huevo	
A17	2017	Folículo ovárico	
H8	2012	Heces humanas	Inf2
A18	2016	Carcasa pollo	
A19	2015	Carcasa pollo	
H9	2012	Heces humanas	
A20	2017	Cáscara de huevo	
A21	2017	Cáscara de huevo	Inf3
A22	2016	Vísceras (pollo)	
H10	2017	Heces humanas	
A23	2017	Cáscara de huevo	
A24	2017	Cáscara de huevo	
A25	2017	Cáscara de huevo	Inf4
H11	2013	Heces humanas	
A26	2013	Carcasa pollo	
A27	2017	Cáscara de huevo	
H12	2013	Heces humanas	
A28	2017	Cáscara de huevo	Inf6
A29	2017	Cáscara de huevo	
A30	2017	Carcasa pollo	
H13	2014	Heces humanas	
H14	2014	Heces humanas	
A31	2017	Cáscara de huevo	Inf7
H15	2013	Heces humanas	
H16	2014	Heces humanas	
H17	2016	Heces humanas	
H18	2016	Heces humanas	

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluaron los serovares de *S. Typhimurium* (7), *S. Kentucky* (4), *S. Enteritidis* (8) y *S. Infantis* (30), obtenidos a partir de aislados clínicos humanos (heces) y productos aviares (carcasa de pollo de engorde, huevos comerciales, hisopados cloacales y cama de ave), para establecer su relación o similitud genética, mediante la técnica de Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), y así, poder comprender el papel que cumplen los productos aviares en las infecciones humanas.

Se evaluaron siete aislados de *S. Typhimurium* por PFGE; el pulsotipo Typ4, presentó un aislado de origen humano (H1), que estaba relacionado con una similaridad del 100 %, con un aislado de carcasa de pollo de engorde (A4), estos resultados plantean un problema de seguridad alimentaria; de acuerdo a lo indicado por Ferrari *et al.*, (2019), este serovar se ha generalizado en una amplia variedad de alimentos; por ello, está involucrado en casos de brotes, así, la salmonelosis humana, por *S. Typhimurium*, fue atribuida a carne de pollo de engorde en un 10.4% de los brotes, en un estudio de 4093 brotes de ETAS (Greig y Ravel, 2009).

S. Typhimurium puede sobrevivir al ambiente ligeramente ácido de los intestinos del pollo (Capita *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2004); por ello, su localización principal es el contenido intestinal de pollos infectados (Buckley *et al.*, 2006), así, un mismo clon de *S. Typhimurium* puede contaminar mediante: las heces, las carcasas y los huevos; para posteriormente llegar al humano; y es lo que observamos en nuestro estudio, donde un aislado humano (H1) está relacionado con el aislado de hisopado cloacal aviar (A5) con un 96% de similaridad.

Los aislamientos de *S. Typhimurium* relacionados, de origen humano (H1) y aviar (A5), fueron obtenidos en la misma región, con diferencia de un año (2012 y 2013, ver cuadro 5), durante ese tiempo se han mantenido relacionados, es decir, no se ha producido más de un evento o cambio genético, como mutaciones, recombinaciones, etc. (Tenover *et al.*, 1995, 1997). Al respecto, si bien PFGE, indica la relación entre aislados; no da más información del porqué de ello; en ese sentido, teniendo en cuenta el uso de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), se podría explicar. En aislados relacionados, se considera cambios de 0-5 SNP como normales; y para aislados de *S. Typhimurium*, se ha reportado una tasa de sustitución de 3-5 SNP al año (Hawkey *et al.*, 2013), esto podría justificar, porque se mantiene la clonalidad de los aislados en este periodo de tiempo, en el presente estudio.

Cronológicamente, el aislado humano H1, se detectó antes (2012) que el aislado aviar A5 (2013); puede haber ocurrido dos situaciones: primero, tanto el humano, como el pollo de engorde; pudieron contaminarse con el mismo clon de *S. Typhimurium*, de una fuente común o relacionada, en diferentes tiempos. En segundo lugar, puede ser, que el aislado pasó del humano al pollo de engorde; esta situación podría ocurrir, ya que existe diferencias entre países y regiones influenciadas por la cultura de higiene de la población y la práctica de producción de alimentos (WHO, 2015). Un humano portador con mala higiene, mediante sus heces; podría contaminar el alimento en algún punto (Cummings *et al.*, 2012), y permitir que el aislado continúe circulando. La investigación epidemiológica (edad, lugar, ocupación, etc.) es crucial, y aclararía mejor este punto (Hawkey *et al.*, 2013).

En el presente estudio, el aislado humano (H1) de *S. Typhimurium*, no estuvo relacionado con los aislados de huevos comerciales (A2, A3) y vísceras de gallina (A1); con quienes tuvo una similaridad de 27.7% (ver figura 1), tampoco estuvo relacionado con otro hisopado cloacal (A6), con quien tuvo una similaridad del 88.2%. Esto puede deberse a la variedad de pulsotipos que puede presentar *S. Typhimurium*, tal como se reporta en un estudio de 2017, donde a partir de 138 aislados de *S. Typhimurium*, de carcasa de pollo de engorde, se encontraron 66 pulsotipos diferentes (Li *et al.*, 2017).

La variedad de pulsotipos que puede observarse en *S. Typhimurium*, puede explicarse por la existencia de patovariantes (Branchu *et al.*, 2018), que a su vez tienen como base genética, la diferenciación en dos clados (α y β) y dentro de estos; múltiples subclados, que luego se van a expresar de forma distintiva, en su adaptación a los hospedadores y selección antropogénica. El clado α contiene varios subclados compuestos por cepas de brotes, aisladas de animales domésticos (ganado y aves de corral) y humanos, mientras que el clado β contiene múltiples subclados asociados

con especies de aves silvestres y se asocian con menor frecuencia a la salmonelosis humana (Bawn *et al.*, 2020).

Los cuatro aislados de *S. Kentucky* estudiados, se distribuyeron en tres pulsotipos diferentes. La similitud genotípica entre los tres pulsotipos fue de 83.2% (ver figura 2) y esto coincide con lo reportado en 2020 por Xiong *et al.*, donde 63 aislados de *S. Kentucky* de fuentes humanas y de un mercado minorista de pollos de engorde, se agruparon en 19 pulsotipos con un porcentaje de similitud >80%. Los tres aislados aviares del presente estudio estaban relacionados con el pollo de engorde; y precisamente este serovar fue identificado como el de mayor frecuencia en pollos de engorde en los EE.UU. entre 1998 y 2013, lo que representa entre el 25% y el 51% de todos los aislados (Haley *et al.*, 2019).

Es de importancia comparar los aislados clínicos humanos con los aislados recuperados de pollos de engorde o derivados, debido a la alta frecuencia encontrada de *S. Kentucky* en esta matriz, ya que comúnmente este serovar llega a colonizar el tracto gastrointestinal de las aves de corral y otros animales domésticos, pero es un patógeno ocasional para los seres humanos (Haley *et al.*, 2017; Karraouan *et al.*, 2017; Vosik *et al.*, 2018).

Se observó que el aislado de *S. Kentucky* de origen humano (H2) estaba relacionado con un 92.9 % de similaridad con el aislado de hisopado cloacal de pollo de engorde (A9). Estos resultados son similares a los hallados por Turki *et al.* en 2014, donde tres aislados de origen aviar tuvieron 100% de similaridad, es decir fueron idénticos, al aislado de origen humano. Sobre estos hallazgos, si bien es cierto, la relación de este serovar con brotes de salmonelosis en humanos es poco común, con porcentajes inferiores al 1% en los EE.UU., la posibilidad existe, debido a los altos niveles de aislamiento en aves y derivados (Ferrari *et al.*, 2019).

La salmonelosis humana asociada a *S. Kentucky* varía geográficamente, así, en América, son muy pocos los aislados; por ejemplo, en los EE.UU., se informó solo el 0.2% del total de casos notificados (CDC, 2013), similar a nuestro estudio: de los 18 aislados humanos, solo uno correspondía a *S. Kentucky*. Mientras que en otras partes del mundo se observan mayores porcentajes de casos asociados a este serovar, como: 1% en Francia, entre 2000-2011 y 13% en Marruecos, entre 2003-2011 (Le Hello *et al.*, 2013).

En el presente estudio se observó, que los aislados de *S. Enteritidis* de origen aviar presentan una similaridad entre el 87.8% y 96% (ver figura 3). De igual manera, los aislados de *S. Enteritidis* de origen humano, están altamente relacionados con 96.3 y 100 % de similaridad (ver figura 3). Estudios previos reportan esta alta homogeneidad (mayor al 90%) entre los aislados de origen aviar de *S. Enteritidis*, es decir es un serovar altamente clonal (Rahmani *et al.*, 2013;

Hadžiabdić *et al.*, 2015; Monte *et al.*, 2020). Esto sugiere que los aislados podrían provenir de un ancestro común que se ha propagado por la región (Zhang *et al.*, 2021).

Rahmani *et al.* (2013) encontraron una similaridad del 100% entre aislados de *S. Enteritidis* de origen aviar, provenientes de pollo de engorde; en 2015, Hadžiabdić y colaboradores, reportaron aislados con una similaridad entre el 96-100% en aislados de *S. Enteritidis* de pollo de engorde; además, Müştak *et al.* (2021) encontraron una similaridad mayor del 90% entre aislados de *S. Enteritidis* provenientes de muestras ambientales (polvo y cama) de granjas de reproductoras; estos resultados coincidieron con dos aislados del presente estudio (similaridad 96%): A10 (cama de ave) y A11 (yema de huevo), lo que sugiere una fuente común de infección o una población homogénea de *S. Enteritidis*.

Esto sugiere que la contaminación de los huevos por *S. Enteritidis* a nivel de granja puede persistir hasta la venta minorista; ya que *Salmonella* puede colonizar el tracto reproductivo de las ponedoras comerciales y contaminar el ambiente interno de los huevos en formación, mediante la transmisión transovárica (Martelli y Davies, 2012; Galiş *et al.*, 2013; Im *et al.*, 2015).

Los aislados aviares obtenidos a partir de huevos comerciales: A12 (yema) y de la producción primaria: A10 (cama de ave) presentaron una similaridad superior al 87%. Similar porcentaje fue encontrado por Long *et al.* en 2017, donde cepas de *S. Enteritidis* aislada de diferentes puntos de la cadena de producción de huevos (granja y venta minorista) tenían más del 85% de similaridad; estos valores nos indican que estos aislados aviares no están relacionados, a pesar de la alta clonalidad descrita para el serovar *Enteritidis* (Monte *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Esto posiblemente se justifique debido a la cronología de los aislados: A10 (2012) y A12 (2017), que son distantes, pudiendo haber ocurrido más de tres eventos genéticos en este tiempo (Tenover *et al.*, 1995, 1997).

Los casos humanos de *S. Enteritidis* están comúnmente relacionados con el consumo de huevos y aves de corral contaminados (Howard *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2017). Por ejemplo en 2021 Müştak *et al.* encontraron aislados de *S. Enteritidis* de origen humano y origen aviar altamente relacionados, con una similaridad mayor al 99%; sin embargo, a pesar de la alta relación genética observada entre los aislados de cada origen por separado (aviar o humano); en el presente estudio no se encontró relación entre los aislados de *S. Enteritidis* de origen humano con los de origen aviar (yema de huevo y cama de ave), presentando una similaridad del 68.5% (ver figura 3).

Esta falta de relación entre aislados de origen humano con los de origen aviar (yema de huevo o cama de ave) puede deberse a que el aislado humano tiene como origen otra fuente alimentaria. Sobre ello, se ha reportado que *S. Enteritidis* se ha relacionado principalmente con

fuentes de pollos de engorde (62,6% de los aislamientos de *S. Enteritidis* fueron de parvadas de pollos de engorde y carne) y en menor porcentaje con gallinas ponedoras y huevos (28,4%) (EFSA y ECDC, 2024). Otra opción, es que se trate de un evento genético (mutaciones puntuales, recombinación, etc.) que puede dar lugar a un cambio en los patrones de bandas PFGE (Herschleb *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2019).

Salmonella Infantis representa una amenaza cada vez mayor para la salud pública debido a su propagación en muchos países y su asociación con altos niveles de resistencia a los antimicrobianos asociado a la presencia del megaplásmido pESI (Mattock *et al.*, 2024). Así, en la Unión Europea el serovar Infantis representó el 46,5 % (parvada de pollo de engorde) y el 50,6 % (carne de pollo) de los aislados de *Salmonella* en 2017 (EFSA, 2018). En Eslovenia, se encontró un 92% en carcasa de pollo de engorde fresca y 100 % en preparaciones de carne de pollo (Pate *et al.*, 2019).

Algunos aislados de *S. Infantis* evaluados en el presente estudio, estuvieron relacionados, así, se observaron aislados de origen humano y aviar con porcentajes de similitud mayores al 93% y 92%, respectivamente. Esto coincide a lo reportado por Rahmani *et al.* (2013) donde encontraron 100% de similitud entre los aislados de *S. Infantis* de origen aviar, obtenidos a partir de heces e hisopados cloacales. En otro estudio Nógrády *et al.* (2012), encontraron una similitud del 92% entre los 76 aislados de *S. Infantis* provenientes de carne y heces de pollos de engorde. Igualmente, en 2016 Vinueza-Burgos y colaboradores, en Ecuador, encontraron 12 aislados de *S. Infantis* de origen aviar con similitudes superiores al 88% en aislados de heces de pollos de engorde; estos estudios sugieren una clonalidad existente en este serovar.

Estudios más recientes, corroboran que *S. Infantis* continúa siendo altamente clonal; así, en 2019, Pate y colaboradores reportaron 16 aislados de *S. Infantis* con similitudes mayores al 90%, en aislados de heces de pollos de engorde en Eslovenia. Taheri *et al.* (2018) reportaron similitudes superiores al 90% entre 27 aislados de *S. Infantis* de origen aviar provenientes de pollo de engorde, reproductora de pollo de engorde y ponedoras comerciales. Esto se debe posiblemente a que *S. Infantis* tiene un ancestro reciente, con un número limitado de cambios evolutivos importantes acumulados por el momento (Hauser *et al.*, 2012; Rahmani *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se observó que algunos aislados de origen humano están relacionados con los aislados de carcasa de pollo de engorde, con similitudes del 95.5% al 100%. Esta similitud entre las dos matrices han sido reportadas anteriormente, así, Raseta y colaboradores, en 2015 encontraron aislados de *S. Infantis* con una similitud del 100% entre aislados de la piel de carcasa de pollo de engorde y humanos infectados. Al respecto, existe evidencia consistente que *S. Infantis* está fuertemente ligado al pollo de engorde y sus derivados

(Montoro *et al.*, 2023) y es el cuarto serovar más importante asociado con enfermedades humanas, lo que indica un problema de seguridad alimentaria (EFSA, 2018).

En Hungría el mismo clon de *S. Infantis* se propagó desde las granjas de pollos de engorde evaluadas, contaminando la planta de faenamiento y la carne vendida al por menor, posteriormente se reportaron en los casos clínicos humanos de la región evaluada; se observó que se trataba de un clon dominante característico de la población de pollos de engorde y humana de todo el país que había sido detectado anteriormente (Nógrády *et al.*, 2008). Esta alta homogeneidad, sugiere el resultado de la expansión de un mismo clon de *S. Infantis* entre ambas matrices (Pate *et al.*, 2019); en el presente estudio observamos algunas cepas con este comportamiento.

Si bien los resultados obtenidos nos muestran que existe relación entre algunos aislados de origen aviar y humano, también encontramos diferencias entre aislados (clusters diferentes, que no se encuentran relacionados). Estas diferencias, que pueden ser dadas también por mutaciones puntuales o algún otro cambio en el material genético, no pueden ser explicadas por PFGE; pero si por la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) que puede examinar todo el genoma bacteriano; y actualmente es la técnica que proporciona el mayor nivel de discriminación entre cepas (Li *et al.*, 2021a).

Las diferencias anteriormente mencionadas, no siempre pueden ser explicadas por PFGE, debido a que esta técnica separa los fragmentos de ADN por tamaño y no por secuencia, por lo tanto, no puede proporcionar información genética (como mutaciones, virulencia, resistencia a los antimicrobianos, etc.) entre los aislados (Ferrari *et al.*, 2017). Es decir, las bandas que se observan separadas por tamaño en una PFGE, podrían no representar la misma secuencia de ADN, incluso una pequeña mutación en un sitio de restricción puede resultar en cambios de múltiples bandas PFGE; en ese sentido la relación indicada por esta técnica no representa una verdadera relación filogenética (Tang *et al.*, 2019).

Para apoyar la comprensión de la relación que pueda existir entre cepas de *Salmonella*, otros métodos de tipificación fenotípicos como: el perfil de resistencia a los antimicrobianos (RAM), pueden complementar los estudios de tipificación molecular, por tener un índice de discriminación considerable; sin embargo, las cepas bacterianas podrían cambiar este perfil debido a la alta frecuencia de transferencia horizontal de genes de resistencia por elementos móviles (Pan *et al.*, 2022).

Los genes de virulencia por sí solos proporcionan una discriminación limitada de los aislamientos de *Salmonella*, así, dos genes de virulencia (*fimH* y *sseL*) pueden proporcionar la misma discriminación, que otros 14 genes de virulencia combinados (Liu *et al.*, 2011); sin embargo,

la tipificación de secuencias de locus de virulencia múltiple CRISPR (CRISPR-MVLST) ha demostrado tener un buen poder discriminatorio (Li *et al.*, 2021b; Pan *et al.*, 2022). Serovares Enteritidis, Typhimurium y Newport, han sido evaluados por CRISPR-MVLST, con resultados que sugieren que esta metodología puede validar y/o complementar los resultados obtenidos por PFGE (Almeida *et al.*, 2013; Shariat *et al.*, 2013).

Como limitaciones del presente estudio, hay que tener en cuenta la cantidad de los aislados: siete, cuatro y ocho aislados para *S. Typhimurium*, *S. Kentucky* y *S. Enteritidis*, respectivamente; se requiere de mayor cantidad de aislados por cada serovar, de fuentes humanas y aviares, para establecer una concordancia epidemiológica de los datos (Li *et al.*, 2021a). Otra limitación observada, es la lentitud del proceso que requiere de tres días para completarse; además de reactivos de alta calidad y equipos especializados, que la vuelven una técnica costosa. A esto se le suma que la técnica debe ser realizada por personal experimentado en el método (Herschleb *et al.*, 2007).

En 2019, Parra-Payano y colaboradores, reportaron el 85.7% de *Salmonella* no tifoidea en niños menores de cuatro años y adultos mayores de 65 años, con cuadro diarreico y febril, en el Hospital Cayetano Heredia, en Lima, Perú. Estos casos no se han podido relacionar directamente con productos aviares; por ello, el presente estudio busca conocer la relación entre los aislados de *Salmonella* de origen humano y de origen aviar; y así reconocer la fuente de los serovares más prevalentes en esta región, responsables de los casos clínicos humanos; y así, se puedan tomar las medidas preventivas y correctivas por las entidades responsables como el Ministerio de Salud (MINSA) y el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) del Perú, en diferentes niveles.

VI. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar acciones de vigilancia epidemiológica más estrictas, con el objetivo de conocer los subtipos de *Salmonella* circulante en los diferentes niveles donde pueda ocurrir la contaminación con esta bacteria: en la producción primaria, en el manejo de las aves durante la fase de faenamiento, y durante el expendio y preparación de alimentos. Para ello, se requiere de una validación adicional con el uso WGS y una mayor cantidad de aislamientos bacterianos.

Para futuros trabajos, se recomienda tener en cuenta la investigación epidemiológica (trazabilidad de los casos) para vincular los casos clínicos humanos con fuentes de alimentos específicas y rastrearlas con un alto grado de confianza; esto permitirá interpretar la relación de los grupos clonales obtenidos por las pruebas de subtipificación, en aquellos casos donde las cepas pertenecen a diferentes tiempos y/o lugares (ciudades, granjas, hospitales, mercados, etc.); sin el contexto epidemiológico, solo podríamos suponer una fuente común (Hawkey *et al.*, 2013).

VII. CONCLUSIONES

- Existen aislados relacionados de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Infantis, en muestras de aves y humanos.
- Algunos aislados de *Salmonella* Kentucky obtenidos de humanos y productos aviares, están relacionados en este estudio.
- Los aislados de *Salmonella* Enteritidis obtenidos de humanos y productos aviares, no se encuentran relacionados en este estudio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abulreesh H. 2012.** *Salmonella* in the Environment. En: Annous B y Gurtler J, eds, *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies. Croacia: InTech. p 19–50.
2. **Almeida F, Pitondo A, Oliveira M, Falcão JP. 2013.** Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. *Infection. Genetics and Evolution* 19: 145–151.
3. **Andreoletti O, Budka H, Buncic S, Colin P, Collins JD, Koeijer D, Griffin J, Havelaar A, Hope J, Klein G, Kruse H, Magnino S, López AM, Mclauchlin J, Nguyen-thé C, Noeckler K, Noerrung B, Maradona MP, Roberts T, Vanopdenbosch E. 2009.** Special measures to reduce the risk for consumers through *Salmonella* in table eggs – e . g . cooling of table eggs 1 Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards Adopted on 22 January 2009. *EFSA Journal* 957: 1–29.
4. **Basim E, Basim H. 2001.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turkish Journal Of Biology* 25(4): 405–418.
5. **Bawn M, Alikhan NF, Thilliez G, Kirkwood M, Wheeler NE, Petrovska L, Dallman TJ, Adriaenssens EM, Hall N, Kingsley RA. 2020.** Evolution of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium driven by anthropogenic selection and niche adaptation. *PLOS Genetics* 16(6): e1008850.
6. **Berger CN, Shaw RK, Brown DJ, Mather H, Clare S, Dougan G, Pallen MJ, Frankel G 2009.** Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *The ISME Journal* 3(2): 261–265.

7. **Bhunia A. 2018.** *Salmonella enterica*. En Bhunia A, eds. Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. 2da ed. USA: Springer. p 271–287.
8. **Branchu P, Bawn M, Kingsley RA. 2018.** Genome Variation and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathovariants. *Infection and Immunity* 86(8).
9. **Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000.** *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38(7): 2465–2467.
10. **Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Ragione RM, Woodward MJ, & Piddock LJV. 2006.** The AcrAB–TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cellular Microbiology* 8(5): 847–856.
11. **Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M. 2007.** Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 103(5): 1366–1375.
12. **Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, De Lencastre H, Almeida, JS. 2005.** Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 43(11): 5483–5490.
13. **Castiglioni E, Kanashiro AM, Stoppa G, Luciano R, De Castro A, Cardoso AL. 2012.** Important Aspects of *Salmonella* in the Poultry Industry and in Public Health. En Mahmoud BSM, eds. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croacia: InTech. p 181–206.
14. **Castillo NA, De Moreno A, Galdeano CM, Perdigón G. 2012.** Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis. Immune mechanisms involved. *Food Research International* 45(2): 831–841.
15. **[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2011.** Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2010. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 60: 749–755.
16. **[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2013.** National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report 2013.
17. **[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2016.** National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report 2016.

18. **Chang KM, Huang WC, Chiou CS, Shen GH, Huang CC, Wen FS. 2013.** Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 46(3): 195–201.
19. **Chu G, Vollrath D, Davis RW. 1986.** Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234(4783): 1582–1585.
20. **Cummings P, Sorvillo F, Kuo T. 2012.** The Burden of Salmonellosis in the United States. En Mahmoud BSM, eds. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croatia: InTech. p 1–20.
21. **De Freitas CG, Santana ÂP, Da Silva PHC, Gonçalves VSP, Barros M, Torres FAG, Murata LS, Perecmanis S. 2010.** PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology* 139(1–2): 15–22.
22. **De Reu K, Grijspeerdt K, Messens W, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, Herman L. 2006.** Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* 112(3): 253–260.
23. **Dunnen JT, Van Ommen GJ. 1993.** Methods for pulsed-field gel electrophoresis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 38(1–2): 161–177.
24. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2011.** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9(3): 2090.
25. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2018.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12): 5500.
26. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2021.** The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19(12): 6971.
27. **[EFSA, ECDC] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2024.** The European Union One Health 2023 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 22(12): e9106

28. **Eng SK, Pusparajah P, Mutalib N, Ser HL, Chan KG, Lee LH. 2015.** *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance 8(3): 284–293.
29. **Félix B, Roussel S, Pot B. 2015.** Harmonization of PFGE profile analysis by using bioinformatics tools: Example of the *Listeria monocytogenes* European union reference laboratory network. *Methods in Molecular Biology* 1301: 9–28.
30. **Ferrari RG, Panzenhagen PHN, Conte-Junior CA. 2017.** Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella* Typhimurium source tracking. *Frontiers in Microbiology* 8: 292794.
31. **Ferrari RG, Rosario DK, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EE, Conte-Juniora CA. 2019.** Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: A meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 85(14): e00591-19.
32. **Galiş AM, Marcq C, Marlier D, Portetelle D, Van I, Beckers Y, Théwis A. 2013.** Control of *Salmonella* Contamination of Shell Eggs—Preharvest and Postharvest Methods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12(2):155-182.
33. **Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. 2008.** *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Genes Induced during Oviduct Colonization and Egg Contamination in Laying Hens. *Applied and Environmental Microbiology* 74(21): 6616.
34. **Garaizar J, López N, Laconcha I, Baggesen DL, Rementeria A, Vivanco A, Audicana, A, Perales I. 2000.** Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12): 5273–5281.
35. **Gast RK. 2013.** Paratyphoid Infections. En Swayne DE, eds. *Diseases Poultry*. 13th ed. USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 693–706.
36. **Gerner P, Graves LM, Hunter S, Swaminathan B. 1998.** Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns: Comparative evaluation of two commercial software packages. *Journal of Clinical Microbiology* 36(5): 1318–1323.
37. **Giaccone V, Catellani P, Alberghini L. 2012.** Food as Cause of Human Salmonellosis. En Mahmoud BSM, eds. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croacia: InTech. p 47–72.

38. **Goering RV. 2010.** Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. In *Infection, Genetics and Evolution* 10 (7): 866–875.
39. **Goering RV, Ribot EM, Gerner-Smidt P. 2011.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Laboratory and Epidemiologic Considerations for Interpretation of Data. En Persing D, eds. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2da ed. USA: ASM Press. p 167–177.
40. **Gómez CA, Torres M, Villareal A, Castro J. 2012.** The Role of Foods in *Salmonella* infections. En Mahmoud BSM, eds. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croacia: InTech. p 21–46.
41. **Gray J, Fedorka-Cray P. 2002.** *Salmonella*. En Cliver DO, Riemann H, eds. *Foodborne diseases*. 2da ed. USA: Academic Press. p 55–68.
42. **Greenberg B, Klowden M. 1972.** Enteric bacterial interactions in insects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 25: 1459–1466.
43. **Greig JD, Ravel A. 2009.** Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology* 130(2): 77–87.
44. **Grimont P, Weill F. 2007.** Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovar. 9a ed. Institut Pasteur. Francia.
45. **Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields P, Bockemühl J, Grimont P, Weill F. 2010.** Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161(1): 26–29.
46. **Hadžiabdić S, Rešidbegović E, Kušar D, Mićunović J, Očepek M. 2015.** Distribution of *Salmonella* Enteritidis genotypes among selected broiler flocks in Bosnia and Herzegovina. *Slovenian Veterinary Research* 52(4): 193–200.
47. **Haley BJ, Luo Y, Wang C, Brown E, Allard M, Karns JS, Van Kessel JAS. 2017.** Genome Sequences of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Kentucky Sequence Type 152 Isolated from Dairy Cows in the United States. *Genome Announcements* 5(42).
48. **Haley BJ, Kim SW, Haendiges J, Keller E, Torpey D, Kim A, Crocker K, Myers RA, Van Kessel JAS. 2019.** *Salmonella enterica* serovar Kentucky recovered from human clinical cases in Maryland, USA (2011–2015). *Zoonoses and Public Health* 66(4): 382–392.

49. **Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Prager R, Schroeter A, Rabsch W, Fruth A, Toboldt A, Malorny B. 2012.** Clonal dissemination of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Germany. *Foodborne Pathogens and Disease* 9(4): 352–360.
50. **Hawkey J, Edwards DJ, Dimovski K, Hiley L, Billman-Jacobe H, Hogg G, Holt KE. 2013.** Evidence of microevolution of *Salmonella* Typhimurium during a series of egg-associated outbreaks linked to a single chicken farm. *BMC Genomics* 14(1): 1–15.
51. **Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. 2007.** Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols* 2(3): 677–684.
52. **Howard ZR, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC. 2012.** *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Research International* 45(2): 755–764.
53. **Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley, D, Barrett T, Ribot E. 2005.** Establishment of a universal size standard strain for use with the pulsenet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology* 43(3): 1045–1050.
54. **Im, MC, Jeong SJ, Kwon YK, Jeong OM, Kang MS, Lee YJ. 2015.** Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from commercial layer farms in Korea. *Poultry Science* 94(7): 1691–1698.
55. **Imen B, Ridha M, Mahjoub A. 2012.** Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the “Old” Organism That Continued Challenges. En Mahmoud BSM, eds. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croacia: InTech. p 349–372.
56. **Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, De Pinna E, Nair S, Fields P, Weill F. 2014.** Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 165(7): 526–530.
57. **Jasson V, Baert L, Uyttendaele M. 2011.** Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. *International Journal of Food Microbiology* 145(2–3): 488–491.
58. **Karraouan B, Ziyate N, Ed-Dra A, Amajoud N, Boutaib R, Akil A, El Allaoui A, El Ossmani H, Zerouali K, Elmdaghri N, Bouchrif B. 2017.** *Salmonella* Kentucky: Antimicrobial resistance and molecular analysis of clinical, animal and environment isolates, Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries* 11(4): 368–370.

59. **Kauffmann F. 1941.** A Typhoid Variant and a New Serological Variation in the Salmonella Group. *Journal of Bacteriology* 41(2): 127–140.
60. **Kehrenberg C, Friederichs S, De Jong A, Michael GB, Schwarz S. 2006.** Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene qnrS in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(1), 18–22.
61. **Khaita M, Doetkott D. 2012.** Antimicrobial Drug Resistance and Molecular Characterization of *Salmonella* Isolated from Domestic Animals, Humans and Meat Products. En Mahmoud BSM, eds. *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Croacia: InTech p. 215–258.
62. **Kim A, Young JL, Min SK, Sang IK, Jae KC. 2007.** Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science* 8(2): 155.
63. **Kottwitz LBM, De Oliveira T, Alcocer I, Farah SM, Abrahão WS, Rodrigues DD. 2010.** Epidemiological data of salmonellosis outbreaks occurred between 1999 and 2008 in Parana State, Brazil. *Acta Scientiarum - Health Sciences* 32(1): 9–15.
64. **Le Hello S, Bekhit A, Granier SA, Barua H, Beutlich J, Zajac M, Münch S, Sintchenko V, Bouchrif B, Fashae K, Pinsard JL, Sontag L, Fabre L, Garnier M, Guibert V, Howard P, Hendriksen RS, Christensen JP, Biswas PK, Weill FX. 2013.** The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. *Frontiers in Microbiology* 4(DEC).
65. **Lee SK, Chon JW, Song KY, Hyeon JY, Moon JS, Seo KH. 2013.** Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella Gallinarum* isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poultry Science* 92(10): 2789–2797.
66. **Li K, Ye S, Alali WQ, Wang Y, Wang X, Xia X, Yang B. 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: 36–42.
67. **Li IC, Wu R, Hu CW, Wu KM, Chen ZW, Chou, CH. 2021a.** Comparison of conventional molecular and whole-genome sequencing methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar schwarzengrund isolates obtained from food and animal sources. *Microorganisms* 9(10): 2046.

68. **Li C, Wang Y, Gao Y, Li C, Ma B, Wang H. 2021.** Antimicrobial Resistance and CRISPR Typing Among *Salmonella* Isolates From Poultry Farms in China. *Frontiers in Microbiology* 12: 730046.
69. **Lindhardt C, Schonenbrucher H, Jorg S, Andreas B, Rolf O, Junge B, Berghof-jager K. 2009.** Foodproof *Salmonella* Detection Kit. Performance Tested Method 120301 - PubMed. *Journal of AOAC International* 92: 30–33.
70. **Liu F, Barrangou R, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Knabel SJ, Dudley EG. 2011.** Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(6): 1946–1956.
71. **Lo Fo Wong DMA, Hald T, Van Der Wolf PJ, Swanenburg M. 2002.** Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science* 76(3): 215–222.
72. **Long M, Yu H, Chen L, Wu G, Zhao S, Deng W, Chen S, Zhou K, Liu S, He L, Ao X, Yan Y, Ma M, Wang H, Davis MA, Jones L, Li B, Zhang A, Zou L. 2017.** Recovery of *Salmonella* isolated from eggs and the commercial layer farms. *Gut Pathogens* 9(1): 1–9.
73. **Lopez L, Martinez MB, Herrera JA, Flores E. 2019.** Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Analytical Biochemistry* 573: 17–29.
74. **Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013.** *Clinical Veterinary Microbiology*. 2da ed. USA. Mosby Ltd. 256 p.
75. **Martelli F, Davies RH. 2012.** *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International* 45(2): 745–754.
76. **Mattock J, Chattaway MA, Hartman H, Dallman T J, Smith AM, Keddy K, Petrovska L, Manners EJ, Duze ST, Smouse S, Tau N, Timme R, Baker DJ, Mather AE, Wain J, Langridge GC. 2024.** A One Health Perspective on *Salmonella enterica* Serovar Infantis, an Emerging Human Multidrug-Resistant Pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 30(4): 701–710.
77. **Maule J. 1998.** Pulsed-field gel electrophoresis. In *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 9 (2): 107–126.
78. **McQuiston JR, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM. 2008.** Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends in Microbiology* 16(4):142–148.

79. **Mead G, Lammerding AM, Cox N, Doyle MP, Humbert F, Kulikovskiy A, Panin A, Do Nascimento VP, Wierup M. 2010.** Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: A global perspective. *Journal of Food Protection* 73(8): 1566–1590.
80. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2008.** NTS N° 071-MINSA/DIGESA: Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano [Internet], [28 enero 2025]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2015/07/CRITERIOS-MICROBIOLOGICOS-RM-591-2008-MINSA.pdf>
81. **Monte DFM, Andrigheto C, Ribeiro VB, Landgraf M, Destro MT. 2020.** Highly clonal relationship among *Salmonella* Enteritidis isolates in a commercial chicken production chain, Brazil. *Braz J Microbiol* 51(4): 2049-2056.
82. **Montoro L, Lorenzo L, Marco A, Vega S, Marin C. 2023.** Holistic Strategies to Control *Salmonella* Infantis: An Emerging Challenge in the European Broiler Sector. *Microorganisms* 11: 1765.
83. **Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, Barrow PA, Maskell DJ, Wallis TS. 2004.** Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* 54(4): 994–1010.
84. **Müştak I, Müştak H, Sariçam İnce, S. 2021.** Genotypic correlation between *Salmonella* Enteritidis isolates from broiler breeders and hatchery flocks. *Acta Veterinaria-Beograd* 4: 392–402.
85. **Neoh H, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. 2019.** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. In *Infection, Genetics and Evolution* 74: 103935.
86. **Nógrády N, Kardos G, Bistyák A, Turcsányi I, Mészáros J, Galántai Z, Juhász Á, Samu P, Kaszanyitzky J, Pásztai J, Kiss I. 2008.** Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 127(1–2): 162–167.
87. **Nógrády N, Király M, Davies R, Nagy B. 2012.** Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *International Journal of Food Microbiology* 157(1): 108–112.

88. **Pan H, Jia C, Paudyal N, Li F, Mao J, Liu X, Dong C, Zhou K, Liao X, Gong J, Fang W, Li X, Kehrenberg C, Yue M. 2022.** Comprehensive Assessment of Subtyping Methods for Improved Surveillance of Foodborne *Salmonella*. *Microbiology Spectrum* 10(5): e0247922
89. **Parra-Payano V, Rondón-Paz C, García C. 2019.** Salmonelosis invasiva en un hospital de Lima, Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 36(3):464-8.
90. **Paramithiotis S, Hadjilouka A, Drosinos E. 2015.** Molecular typing schemes of food-associated salmonellae. En Hackett C, eds *Salmonella* prevalence, risk factors and treatment options. USA: Nova Science Publishers, Inc. p 159–178.
91. **Pate M, Mičunovič J, Golob M, Vestby LK, Ocepek M. 2019.** *Salmonella* Infantis in Broiler Flocks in Slovenia: The Prevalence of Multidrug Resistant Strains with High Genetic Homogeneity and Low Biofilm-Forming Ability. *BioMed Research International* 2019: 13
92. **Pickard D, Thomson NR, Baker S, Wain J, Pardo M, Goulding D, Hamlin N, Choudhary J, Threfall J, Dougan G. 2008.** Molecular characterization of the *Salmonella enterica* serovar typhi Vi-typing bacteriophage E1. *Journal of Bacteriology* 190(7) 2580–2587.
93. **Popoff M, Bockemühl J, Gheesling L. 2004.** Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 155(7): 568–570.
94. **Popoff M, Le Minor L. 2005.** *Salmonella*. En Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley J, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da ed. USA: Springer. p 764–799.
95. **Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah Y, Son R. 2011.** *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 18: 465–473.
96. **Pulido M. 2019.** Food safety - *Salmonella* update in broilers. In *Animal Feed Science and Technology* 25: 53–58.
97. **PulseNet. 2013.** Standard operating procedure for pulsenet pfge of escherichia coli o157:h7, escherichia coli non-o157 (stec), salmonella serotypes, shigella sonnei and shigella flexneri. PNL05 Last Updated April 2013
98. **PulseNet. 2017.** Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157: H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri. PNL05 Last Updated December 2017.

99. **Rahmani M, Peighambari SM, Svendsen CA, Cavaco LM, Agersø Y, Hendriksen RS. 2013.** Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. BMC Veterinary Research 9(1): 1–9.
100. **Raseta M, Djordjevic V, Vidanovic D. 2015.** Contamination Routes of *S. Infantis* in Food Chain of Broiler Meat Production and it's Significance for Public Health. Procedia Food Science 5: 254–257.
101. **Rementeria A, Gallego L, Quindós G, Garaizar J. 2001.** Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. Clinical Microbiology and Infection 7(6): 331–336.
102. **Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ 2006.** Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogens and Disease 3(1): 59–67.
103. **Rodney M. 2013.** *Enterobacteriaceae: Salmonella*. En McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. Veterinary Microbiology. 3era ed. USA: Wiley-Blackwell. p 75–84.
104. **Rodríguez R, Bernal JF, Cifuentes, JF, Fandiño LC, Herrera, MP, Rondón I, García NV. 2021.** Prevalence and Molecular Characterization of *Salmonella* Isolated from Broiler Farms at the Tolima Region—Colombia. Animals 11(4): 970.
105. **Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. 2017.** Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. BioMed Research International 2017: 3782182
106. **Sandora TJ, Gerner-Smidt P, McAdam AJ. 2014.** What's Your Subtype? The Epidemiologic Utility of Bacterial Whole-Genome Sequencing. Clinical Chemistry 60(4): 586-588.
107. **Setta AM, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA. 2012.** Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: Cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 35(5): 397–410.

108. **Shariat N, DiMarzio MJ, Yin S, Dettinger L, Sandt CH, Lute JR, Barrangou R, Dudley EG. 2013.** The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. *Food Microbiology* 34(1): 164–173.
109. **Smith S, Ajayi A, Seriki A. 2018.** *Salmonella*. En Liu D, eds. *Handbook of Foodborne Diseases*. USA: CRC Press. p 409–416
110. **Su LH, Chiu CH, 2007.** *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Chang Gung Med* 30: 210–219
111. **Taheri H, Peighambari S, Shahcheraghi F, Solgi H. 2018.** Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* Serovar Infantis Isolates From Poultry. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 12(3): 187–198.
112. **Tang S, Orsi RH, Luo H, Ge C, Zhang G, Baker RC, Stevenson A, Wiedmann M. 2019.** Assessment and comparison of molecular subtyping and characterization methods for *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology* 10: 461130.
113. **Tenover F, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. In *Journal of Clinical Microbiology* 33 (9): 2233–2239.
114. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. 1997.** How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 18(6): 426–439.
115. **Tindall B, Grimont P, Garrity G, Euzéby J. 2005.** Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(1): 521–524.
116. **Tseng DC, Lee YC. 2015.** Automatic band detection on pulsed-field gel electrophoresis images. *Pattern Analysis and Applications* 18(1): 145–155.
117. **Turki Y, Mehri I, Fhoula I, Hassen A, Ouzari H. 2014.** Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of *Salmonella* Kentucky isolates in Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 30(1): 87–98.

118. **Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-smidt P, Brisse S, Struelens M. 2007.** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 13(3): 1–46.
119. **Vinueza-Burgos C, Cevallos M, Ron-Garrido L, Bertrand S, De Zutter L. 2016.** Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age 11(7): e0159567.
120. **Vosik D, Tewari D, Dettinger L, M'Ikanatha NM., Shariat NW. 2018.** CRISPR Typing and Antibiotic Resistance Correlates with Polyphyletic Distribution in Human Isolates of *Salmonella* Kentucky. *Foodborne Pathogens and Disease* 15(2): 101–108.
121. **Weill FX. 2008.** *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2008(400): 37–47.
122. **Wiedemann A, Virlogeux Payant I, Chaussé M, Schikora A, Velge P. 2015.** Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology* 21(5): 791.
123. **[WHO] World Health Organization. 2015.** Who estimates of the global burden of foodborne diseases.
124. **Wunderwald C, Hoop RK. 2002.** Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks. *Avian Pathology* 31(2): 157–162.
125. **Xiong Z, Wang S, Huang Y, Gao Y, Shen H, Chen Z, Bai J, Zhan Z, Wen J, Liao, M, Zhang J. 2020.** Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Kentucky ST198 in Broiler Chicken Supply Chain and Patients, China, 2010–2016. *Microorganisms* 8(1): 140.
126. **Yokoyama E, Uchimura M. 2006.** Optimal settings of fingerprint-type analysing computer software for the analysis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Epidemiology and Infection* 134(5): 1004–1014.
127. **Yousef AE, Carlstrom C. 2003.** *Salmonella*. En Yousef AE, Calstrom C, eds. *Food microbiology: a laboratory manual*. USA: John Wiley & Sons. p 167–205.
128. **Zhang J, Luo W, Liu G, Wang Y, Geng S, Pan Z, Jiao X. 2021.** High genetic similarity of *Salmonella* Enteritidis as a predominant serovar by an independent survey in 3 large-scale chicken farms in China, *Poultry Science* 100(4).

IX. APÉNDICE

Anexo A1: Preparación de buffer de suspensión celular (BSC)

Tris 1 M, pH 8.0	10 ml (6ml)
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20 ml (12ml)
Agua estéril calidad molecular c.s.p.	100 ml (60ml)

Anexo A2: Preparación de buffer de lisis celular (BLC) (Tris 50mM, EDTA 50mM, Sarcosil 1% + 0.1 mg/ml de proteinasa K)

Tris 1M, pH 8.0	25 ml (5ml)
EDTA 0.5M, pH 8.0	50 ml (10ml)
Sarcosyl 10%	50 ml (10ml) o
Sarcosyl N-lauril-sarcosina, sal sódica)	5g (1g)
Agua estéril calidad molecular c.s.p.	500 ml (100ml)

Agregar 25 µL de proteinasa K (20mg/ml) por cada 5mL de BLC al momento de usar para una concentración final en el buffer de lisis de 0.1mg/ml de proteinasa K.

Anexo A3: Preparación de buffer (TE) (Tris10mM, EDTA 1mM)

Tris 1 M, pH 8.0	10 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	2 ml
Agua estéril calidad molecular c.s.p.	1000ml

El buffer TE usa para hacer los plug y para lavarlos después de la lisis.

Anexo A4: Preparación de buffer Tris- Borato EDTA 10X (TBE)

Tris Base 0.9 M	108 g
Ácido bórico 0.9 M	55 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	40 ml
Agua estéril calidad molecular c.s.p.	1000 ml

Anexo A5: Protocolo de Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) PulseNet (2013)

Objetivo: Describir el Protocolo de laboratorio estandarizado de un día (24-26 horas) para la subtipificación molecular de *E. coli* O157:H7, *E. coli* Non-O157 (STEC), *Salmonella*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Digestión de restricción de ADN en tapones de agarosa: Una pequeña porción del tapón de agarosa debe digerirse con la enzima de restricción primaria, otras porciones del tapón pueden someterse a análisis de restricción con enzimas secundarias o terciarias.

Protocolo:

1. Etiquete los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con los números de cultivo; etiquete 3 (gel de 10 pocillos) o 4 (gel de 15 pocillos) tubos para *Salmonella* Braenderup H98121.

2. Paso de incubación previa a la restricción: prepare una mezcla maestra diluyendo el tampón de restricción 10X apropiado (Roche Applied Science o equivalente) 1:10 con agua ultrapura estéril (CLRW)
 3. Agregue 200 µl de tampón de restricción diluido (1X) a los tubos de microcentrifuga de 1,5 ml etiquetados.
 4. Retire con cuidado el tapón del TE con una espátula y colóquelo en una placa de Petri estéril desechable o en un portaobjetos de vidrio grande.
 5. Corte una rebanada de 2,0 a 2,5 mm de ancho de cada muestra de prueba y el número apropiado de *S. Braenderup* H9812 con una hoja de afeitar de un solo filo (o bisturí, cubreobjetos, etc.) y transfíralos a un tubo que contiene restricción diluida.
 3. Agregue 200 µl de tampón de restricción diluido (1X) a los tubos de microcentrifuga de 1,5 ml etiquetados.
 4. Retire con cuidado el tapón del TE con una espátula y colóquelo en una placa de Petri estéril desechable o en un portaobjetos de vidrio grande.
 5. Corte una rebanada de 2,0 a 2,5 mm de ancho de cada muestra de prueba y el número apropiado de *S. Braenderup* H9812 con una hoja de afeitar de un solo filo (o bisturí, cubreobjetos, etc.) y transfíralos a un tubo que contenga tampón de restricción diluido.
- Vuelva a colocar el resto del tapón en el tubo original que contiene 5 ml de tampón TE y guárdelo a 4 °C.
- PulseNet recomienda que se utilicen peines con dientes más grandes (dientes de 10 mm de ancho) para moldear los geles porque el análisis por computadora de los carriles de gel es más preciso y menos tedioso que el análisis de carriles de gel moldeados con peines con dientes más pequeños (5,5 mm). No se recomienda el uso de peines con dientes más pequeños. El número de rebanadas que se pueden cortar de los tapones dependerá de la habilidad y experiencia del operador, la integridad del tapón y si las rebanadas se cortan vertical u horizontalmente (tapones hechos en moldes desechables).
- 5.1. Incube los cortes del tapón de muestra y control en un baño de agua a 37 °C durante 5-10 minutos o a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
 - 5.2. Después de la incubación, retire el tampón del corte del tapón con una pipeta equipada con una punta de 200-250 µl hasta el fondo del tubo y aspire el tampón. Tenga cuidado de no dañar la rebanada del tapón con la punta de la pipeta y que la rebanada del tapón no se deseche con la punta de la pipeta.
6. Prepare la mezcla maestra de enzimas de restricción. Puede mezclar en el mismo tubo que se usó para el tampón de restricción diluido.
- Mantenga el vial de enzima de restricción en hielo o en una caja de almacenamiento aislada (-20°C) en todo momento.
- Adición de albúmina de suero bovino (BSA; altamente recomendada): varios proveedores de enzimas de restricción recomiendan específicamente la adición de 1X BSA a las mezclas de restricción de enzimas, mientras que otros no lo hacen. PulseNet Central recomienda agregar BSA a todas las mezclas de restricción de enzimas para minimizar la incidencia de restricción incompleta.
7. Agregue 200 µl de mezcla maestra de enzimas de restricción a cada tubo. Cierre el tubo y mezcle golpeando suavemente; asegúrese de que las rebanadas del tapón estén debajo de la mezcla de enzimas.
 8. Incube los cortes del tapón de muestra y control en un baño de agua a 37 °C durante 1,5 a 2 horas.
 9. Si se cargarán cortes de tapón en los pocillos, continúe con los Pasos 1 a 4 de la siguiente sección (Elaboración de un gel de agarosa) aproximadamente 1 hora antes de que finalice la reacción de

digestión de restricción para que el gel pueda solidificarse durante al menos 30 minutos antes de cargar los tapones PFGE restringidos.

Elaboración (moldear) de un gel de agarosa

1. Confirme que el baño de agua esté equilibrado a 55-60 °C.
2. Prepare el volumen de tampón Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X que se necesita tanto para el gel como para el tampón de ejecución de electroforesis de acuerdo con una de las siguientes tablas.
3. Prepare agarosa SeaKem Gold (SKG) al 1 % en 0,5X TBE de la siguiente manera:
 - 3.1. Pesar la cantidad adecuada de SKG en un matraz de tapa roscada de 500 ml. Mezcle 1,0 g de agarosa con 100 ml de TBE 0,5X para formar un gel de 14 cm de ancho (10 pocillos)
Mezcle 1,5 g de agarosa con 150 ml de TBE 0,5X para formar un gel de 21 cm de ancho (15 pocillos)
 - 3.2. Agregue la cantidad apropiada de 0.5X TBE; agite suavemente para dispersar la agarosa.
4. Afloje la tapa y cocine en el microondas durante 60 segundos; mezcle suavemente y repita durante intervalos de 15 segundos hasta que la agarosa se disuelva por completo.
5. Regrese el matraz al baño de agua a 55-60 °C y equilibre la agarosa en el baño de agua durante 15 minutos o hasta que esté lista para usar.

Advertencia de seguridad: utilice guantes resistentes al calor cuando manipule termos calientes después del microondas.

Agarose LFTM (Amresco, X174) y Certified Megabase Agarose (Bio-Rad, 161-3108) son las únicas alternativas aceptables a SeaKem Gold, en este momento. El tiempo y la temperatura necesarios para disolver completamente la agarosa dependen de las especificaciones del microondas utilizado y deberán determinarse empíricamente en cada laboratorio. Del mismo modo, el tiempo de ejecución óptimo para cada agarosa deberá determinarse empíricamente en cada laboratorio.

6. Puede ser necesario un pequeño volumen (2-5 ml) de agarosa SKG al 1 % derretida y enfriada (55-60 °C) para sellar los pocillos después de cargar los tapones. Prepárelo como se describió anteriormente. La agarosa SKG sin usar se puede mantener a temperatura ambiente, derretir y reutilizar varias veces.

Coloque la forma de gel en una mesa de nivelación y ajústela hasta que quede perfectamente nivelada. Coloque el soporte del peine de modo que la parte frontal (lado con pequeños tornillos de metal) y los dientes miren hacia la parte inferior del marco del gel y los dientes del peine toquen la plataforma del gel.

7. Saque las rebanadas obstruidas del tapón del baño de agua a 37 °C. Retire la mezcla de enzima/tampón y agregue 200 l 0.5X TBE. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Retire las rebanadas de tapón de los tubos; coloque el peine en la parte superior de la mesa y cargue las rebanadas del tapón en la parte inferior de los dientes del peine de la siguiente manera:
 - 8.1. Carga *S. Braenderup* H9812 en los dientes (carriles) 1, 5, 10 (gel de 10 pocillos) o en los dientes 1, 5, 10, 15 (gel de 15 pocillos).
 - 8.2. Cargue muestras en los dientes restantes y anote las ubicaciones.
9. Retire el exceso de tampón. Permita que las rebanadas del tapón se sequen al aire en el peine durante 3 a 5 minutos o séllelas al peine con agarosa SKG al 1 % (55 a 60 °C).
10. Coloque el peine en forma de gel y confirme que las rebanadas de los tapones estén correctamente alineadas en la parte inferior de los dientes del peine, que el borde inferior de la rebanada de los tapones esté al ras contra la plataforma negra.
11. Vierta con cuidado la agarosa (enfriada a 55-60 °C) en forma de gel y elimine las burbujas o residuos.

12. Coloque el marco de gel negro en la cámara de electroforesis. Añadir 2 -2,2 L TBE 0,5X recién preparado. Cierre la cubierta de la unidad. (La cantidad de tampón necesaria depende de si se dejó tampón residual en el tubo o si la unidad se enjuagó con agua después de ejecutar el último gel).

13. Encienda la fuente de alimentación, la bomba calibrada a un caudal de 1 litro/minuto (configuración de alrededor de 70) y el módulo de refrigeración (14 °C) aproximadamente 30 minutos antes de ejecutar el gel.

14. Retire el peine después de que el gel se solidifique durante 30 a 45 minutos.

15. Rellene los pocillos de gel con agarosa SKG al 1 % derretida y enfriada (55-60 °C) (opcional). Desenrosque y retire las compuertas de los extremos de la forma de gel; elimine el exceso de agarosa de los lados y el fondo de la plataforma de fundición. Mantenga el gel en la plataforma de fundición y coloque con cuidado el gel dentro del marco de gel negro en la cámara de electroforesis. Cierre la tapa de la cámara.

Carga de rebanadas de tapón restringido en los pocillos (método alternativo opcional)

1. Siga los pasos 1 a 4 de la sección Carga de rebanadas de plug restringidas en el peine.

Coloque la forma de gel en una mesa de nivelación y ajústela hasta que quede perfectamente nivelada antes de verter el gel. Coloque el soporte del peine de modo que la parte frontal (lado con tornillos metálicos pequeños) y los dientes miren hacia la parte inferior del gel y el borde inferior del peine quede 2 mm por encima de la superficie de la plataforma del gel.

2. Enfríe la agarosa SKG derretida en un baño de agua a 55-60 °C durante 15-20 min; Vierta cuidadosamente la agarosa en forma de gel (soporte de fundición) equipado con un peine. Asegúrese de que no haya burbujas.

3. Coloque el marco de gel negro en la cámara de electroforesis. Agregue 2-2.2 L de TBE 0.5X recién preparado. Cierre la cubierta de la unidad. (La cantidad de solución amortiguadora depende de si quedó solución residual en el tubo o si la unidad se enjuagó con agua después de ejecutar el último gel).

4. Encienda la fuente de alimentación, la bomba calibrada a un caudal de 1 litro/minuto (ajustado en aproximadamente 70) y el módulo de enfriamiento (14 °C) aproximadamente 30 minutos antes de que se ejecute el gel.

5. Saque las rebanadas obstruidas del tapón del baño de agua a 37 °C. Retire la mezcla de enzima/tampón y agregue 200 l 0.5X TBE. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

6. Retire el peine después de que el gel se solidifique durante al menos 30 minutos.

7. Retire las rebanadas de tapón restringidas de los tubos con el extremo cónico de la espátula y cárguelas en los pozos apropiados. Empuje suavemente los tapones hacia el fondo y el frente de los pocillos con el extremo ancho de la espátula. Manipular la posición con una espátula y asegurarse de que no queden burbujas.

7.1. Carga S. Braenderup H9812 en pocillos (carriles) 1, 5, 10 (gel de 10 pocillos) o en pocillos 1, 5, 10, 15 (gel de 15 pocillos).

7.2. Cargue las muestras en los pozos restantes.

Cargar los bloques pedazos de plugs puede ser tedioso; cada persona tiene que desarrollar su propia técnica para colocar consistentemente las rebanadas del tapón en los pozos para que los carriles queden rectos y las bandas afiladas.

8. Rellene los pocillos de gel con agarosa SKG al 1 % derretida (equilibrada a 55-60 °C). Deje que se endurezca durante 3-5 minutos. Desenrosque y retire las compuertas de los extremos de la forma de gel; Retire el exceso de agarosa de los lados y el fondo de la plataforma de fundición con un pañuelo. Mantenga el gel en la plataforma de fundición y coloque con cuidado el gel dentro del marco de gel negro en la cámara de electroforesis. Cierre la tapa de la cámara.

Condiciones de electroforesis

Cepas de *Salmonella* restringidas con XbaI o AvrII (BlnI):

Seleccione las siguientes condiciones en CHEF DR-III

- o Tiempo de conmutación inicial: 2,2 s
- o Tiempo de conmutación final: 63,8 s
- o Voltaje: 6 V
- o Ángulo incluido: 120°
- o Tiempo de ejecución: 18-19 horas (ver nota a continuación)

Los tiempos de ejecución de la electroforesis recomendados anteriormente se basan en el equipo y los reactivos utilizados en los CDC. Los tiempos de ejecución pueden ser diferentes en su laboratorio y deberán optimizarse para sus geles para que la banda más baja en el S. ser. El estándar Braenderup H9812 migra dentro de 1,0-1,5 cm del fondo del gel.

Tome nota de la lectura inicial en miliamperios (mA) del instrumento. El mA inicial debe estar entre 110-150 mA. Una lectura fuera de este rango puede indicar que el búfer 0.5X TBE se preparó incorrectamente y se debe volver a preparar.

Anexo A6: Flujograma de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Preparación de la muestra

Día 0

Cultivo de *Salmonella* en agar TSA, 37°C x 18 horas.

Preparación de la suspensión celular

Día 1

Colonias aisladas de *Salmonella* son suspendidas en BSC, se ajusta la concentración entre 0.8-1.0 DO (610 nm).

Preparación de Plugs de agarosa

Día 1

En moldes, se mezcla: 5 µl de proteinasa K + 100 µl agarosa SeaKem Gold + 100 µl de la suspensión bacteriana, esperar que se solidifique a T° ambiente.

Lisis celular en Plugs de agarosa

Día 1

Los plugs solidificados se transfieren a tubos con BLC, se añade proteinasa K, se incuban a 54°C x 2 horas a 200 rpm.

Lavado de plugs de agarosa

Día 1

Lavados con buffer TE estéril a 54°C por 10 a 15 min

(6 veces).

Digestión del DNA con enzima de restricción *Xba*I

Día 2

Los plugs lavados se cortan y se les agrega master mix que contiene la enzima *Xba*I (200 µl/plug), se incuba a 37°C x 6 h

Separación de fragmentos de DNA mediante Electroforesis de Campo Pulsado

Día 2

Para la electroforesis en campo pulsado se utilizó la agarosa SeaKem Gold al 1% junto con buffer TBE 0.5X. El proceso se llevó a cabo en el sistema CHEF Mapper XA System

Condiciones:

Pulso inicial: 2.16 s, pulso final: 63.8s
Voltaje: 6V/cm, un ángulo de 120° y 14°C
Tiempo: 18 horas

Tinción y documentación del gel de agarosa

Día 3

Se tiñe con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) por 15 min, para luego ser lavado con agua destilada por 30 min. Se realizó la captura de las imágenes con el Sistema de Documentación

Chemidoc XRS

Análisis de la información

Día 3