

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN
ALIMENTOS (DIPA)
DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

“Diversidad y distribución de *Salmonella enterica* en productos cárnicos avícolas”

PRESENTA

M. en C. Yajaira Esquivel Hernández.

DIRIGIDO POR

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., ABRIL 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Diversidad y distribución de *Salmonella enterica* en productos cárnicos avícolas
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctorado en Ciencia
de los Alimentos

Presenta:
M. en C. Yajaira Esquivel Hernández

Dirigida por:
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Presidente



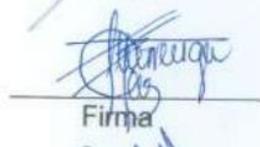
Firma

Dra. María del Pilar Castañeda Serrano
Secretario



Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal



Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Suplente

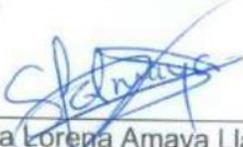


Firma

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Suplente



Firma



Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Abril, 2019
México

RESUMEN

A nivel mundial, las autoridades sanitarias han resaltado la necesidad de mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica de *Salmonella*; especialmente en países en vías de desarrollo, donde la vigilancia del patógeno es escasa o nula. Para atender esta demanda, en el presente trabajo se desarrolló una herramienta molecular para la rápida y eficaz identificación de serotipos de *S. enterica*. A través de análisis genómicos comparativos (n = 548 genomas secuenciados) se demostró que la amplificación, secuenciación y análisis filogenético del gen *atpD* permite la serotipificación molecular de aislamientos de *S. enterica*. La importancia de esta herramienta molecular se demostró en un estudio de prevalencia y diversidad de serotipos de *S. enterica* en granjas, rastros y puntos de venta de carne de pollo en algunos estados del país. La prevalencia del patógeno en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta fue de 27.0%, 32.3% y 21.4%, respectivamente. En general, los serotipos más prevalentes fueron Enteritidis (47.8%, 121/253), seguido de Typhimurium (16.2%, 41/253), Anatum-Saintpaul (8.7%, 22/253), Montevideo (4.3%, 11/253), Infantis (3.6%, 9/253), Choleraesuis (3.6%, 9/253), Tennessee-Agona (2.8%, 7/253), Muenster (2.4%, 6/253), Newport (2.0%, 5/253), Senftenberg (2.0%, 5/253) y otros (6.8%, 17/253). La alta prevalencia de Enteritidis y Typhimurium también ha sido reportada en productos cárnicos avícolas de países europeos y EE.UU., lo que indica que estos dos serotipos se han adaptado exitosamente en la industria avícola a nivel mundial. La implementación de las herramientas desarrolladas en el presente trabajo permitirá generar una base de datos genética de los serotipos endémicos en México; información indispensable como marco de referencia para establecer programas sanitarios de prevención y control de *S. enterica*.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, serotipificación molecular, carne de pollo

SUMMARY

Worldwide, international health organizations have highlighted the need of improving *Salmonella* surveillance systems; especially, in developing countries where epidemiological studies are limited or nonexistent. To address this issue, in the present study, a molecular tool was developed for the rapid and efficient identification of *Salmonella* serotypes. Through comparative genomic analyses (n = 548 whole genomes sequenced), it was demonstrated that amplification, sequencing, and phylogenetic analysis of the *atpD* gene allow the rapid and accurate identification of serotypes. The importance of this molecular tool was demonstrated during studies of prevalence and diversity of *S. enterica* isolated from farms, slaughterhouses and retail markets. Overall, the prevalence of the pathogen in farms, slaughterhouses and retail markets was 27.0%, 32.3% and 21.4%, respectively. The most prevalent serotypes were Enteritidis (47.8%, 121/253), Typhimurium (16.2%, 41/253), Anatum-Saintpaul (8.7%, 22/253), Montevideo (4.3%, 11/253), Infantis (3.6%, 9/253), Choleraesuis (3.6%, 9/253), Tennessee-Agona (2.8%, 7/253), Muenster (2.4%, 6/253), Newport (2.0%, 5/253), Senftenberg (2.0%, 5/253) and others (6.8%, 17/253). A high prevalence of Enteritidis and Typhimurium has been also reported in poultry meat products from E.U. and U.S.A.; indicating a successful adaptation of these serotypes to poultry production systems. The implementation of the molecular tools developed in the present study will help to generate a genetic database of *Salmonella* serotypes endemic in Mexico. This information will be essential to establish programs for prevention and control of *S. enterica*.

Key words: *Salmonella enterica*, molecular serotyping, poultry meat.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por creer en mí, apoyarme y darme siempre ánimos para vencer todo lo que la vida va poniendo en mi camino, los amo con todo mi ser.

A mi hermana y a mi sobrino por hacer mis regresos a casa toda una carga de pila y sonrisas, los amo.

A mi familia académica: A Liz por ser mi mayor confidente y mi amiga, por todas esas veces que llore y que lloremos juntas, por entenderme, aconsejarme y siempre calmarme. Gracias por ser parte de mi vida y compartirme también la tuya, lo atesoro mucho. A los tres loquitos que me acompañaron, me soportaron, me vieron llorar y me consolaron, por todas esas risas juntos. Tienen un lugar especial en mi corazón. (Ricardo, Rene e Iván).

A Lupita y Fer por todas las buenas charlas reflexivas y a veces no muy productivas pero sí llenas de muchas carcajadas. Por escucharme, apoyarme y siempre estar a pie de cañón conmigo los adoro por de loquitas.

A mis niñas y mis niños: Italia y Cristina, por siempre estar para mí, por todo el cariño, por aguantarme en mi peores momentos y en mis peores versiones y aun así aceptarme y darme su cariño, las adoro y saben que por siempre contarán conmigo, gracias por permitirme ser su mamá académica. A Sam, Joana, Erick, Javo y Rojo por siempre tener la disposición para ayudarme, por aguantar mis enojos y regaños, por todas sus palabras de cariño. Los quiero mucho y saben que cuentan conmigo.

A Daniel Fernández Saldaña, si alguien se detiene a leer este escrito y toma la fuerte decisión de hacer un posgrado le recomiendo altamente acompañarlo de un buen psicólogo. Dani no terminaría de enlistar todo lo que gracias a ti logre y conocí de mi misma. GRACIAS por enseñarme tanto.

Al Dr. Eslava por su guía, por su disposición, su apoyo y sus sabios consejos. Lo admiro y lo respeto, gracias por ser parte de esta historia. A la Dra. Pilar, con todo respeto: “mi mamá gallina”, por sus consejos y compartirme su sabiduría, mil gracias.

A la Dra. Montserrat, la Dra. Sofía y el Dr. Mercado por enseñarme y ser parte de mi formación desde la maestría, gracias por tener siempre la puerta abierta para mí.

Al Dr. Gerardo Nava por marcar mi vida, por la paciencia, por la fe en mí, por todas las lecciones de vida que me dio, por ayudarme a que mi ranita brincara más y más fuerte.... Mil gracias.

A CONACYT por haberme apoyado durante mis años de becaria.

INDICE GENERAL

RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Enfermedades gastrointestinales causadas por <i>S. enterica</i> a nivel mundial y en México.	2
II.1.1 Alimentos como vehículo de <i>S. enterica</i>	3
II.2 Consumo y producción de carne de pollo	6
II.3 Prevalencia de <i>S. enterica</i> durante la producción de carne de pollo	9
II.3.1 Granjas avícolas	9
II.3.2 Plantas de procesamiento	10
II. 3.3 Puntos de venta	11
II.4 Métodos convencionales empleados para la detección de patógenos en los alimentos	12
II.5 Análisis moleculares para la detección y caracterización de <i>Salmonella</i> en alimentos	15
II.6 Métodos para la tipificación de <i>Salmonella</i>	18
II.7 Rastreabilidad de microorganismos patógenos mediante análisis genómicos comparativos	22
III HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	25
V.1 Materiales	25
V.1.1 Medios de cultivo	26
V.1.2 Soluciones	26
V.1.3 Reactivos	26
V.1.4 Material biológico	27

V.2 Métodos	28
V.2.1 Validación de ensayos moleculares para la identificación de <i>S. enterica</i>	29
V.2.2 Desarrollo y validación de un ensayo para la serotipificación molecular basado en la secuenciación del <i>atpD</i>	30
V.2.3 Muestreos en granjas avícolas	31
V.2.4 Muestreo en plantas de procesamiento	32
V.2.5 Muestreos en puntos de venta	32
V.2.6 Aislamiento y detección de <i>S. enterica</i>	32
V.2.7 Caracterización de aislamientos de <i>S. enterica</i> .	33
V.2.8 Determinación de la diversidad genética de <i>S. enterica</i> que circulan en la industria avícola	36
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VI.1 Validación de iniciadores de la PCR para la identificación de <i>S. enterica</i>	37
VI.2 Sistema de clasificación <i>atpD</i>	40
VI.3 Prevalencia y diversidad de <i>S. enterica</i> en granjas avícolas	42
VI.4 Prevalencia y diversidad de <i>S. enterica</i> en plantas de procesamiento	44
VI.5 Prevalencia, diversidad y perfiles de resistencia de <i>S. enterica</i> en puntos de venta.	48
VI.6 Prevalencia de <i>S. enterica</i> en la cadena de producción de carne de pollo....	61
VI.7 Panorama general de la diversidad genética y distribución de <i>S. enterica</i> en la cadena de producción de carne de pollo	63
VII Conclusiones	68
VIII BIBLIOGRAFÍA	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Brotes de <i>S. enterica</i> asociados al consumo de alimentos contaminados en EE.UU.	5
Cuadro 2. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en productos cárnicos en países de la Unión Europea.	6
Cuadro 3. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en carne de pollo en puntos de venta a nivel mundial	12
Cuadro 4. Diversidad de medios de cultivo para la detección de <i>Salmonella</i> en diferentes países.	14
Cuadro 5. Pares de iniciadores para la amplificación de <i>S. enterica</i>	30
Cuadro 6. Criterios interpretativos de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos	36
Cuadro 7. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en granjas avícolas	42
Cuadro 8. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en piezas de pollo en plantas de procesamiento.	45
Cuadro 9. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en carne de pollo en puntos de venta.	50
Cuadro 10. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en carne de pollo en puntos de venta en la Unión Europea. Fuente: EFSA, 2013.	50
Cuadro 11. Base de datos parcial del gen <i>atpD</i> depositado en el GenBank.	52
Cuadro 12. Distribución de la diversidad genética de <i>S. enterica</i> en diferentes estados de la República Mexicana.	54
Cuadro 13. Ocurrencia de <i>S. enterica</i> multirresistente en carne de pollo en puntos de venta.	60
Cuadro 14. Prevalencia de serotipos de <i>S. enterica</i> recuperada en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta.	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo <i>per cápita</i> (Kg) de carne de pollo, res y cerdo entre 2005 y 2013 en EE.UU.	7
Figura 2. Producción pecuaria en México en 2013	8
Figura 3. Consumo <i>per cápita</i> de carne de pollo en México	8
Figura 4. Prevalencia de <i>Salmonella</i> Enteritidis en pollos menores de 21 días de edad en diferentes estaciones del año, en EE.UU.	10
Figura 5. Estrategia experimental para determinar la distribución y diversidad de <i>S. enterica</i> en la producción avícola	28
Figura 6. Estrategia para determinar la prevalencia de <i>S. enterica</i> en granjas avícolas.	31
Figura 7. Estrategia general para el aislamiento de <i>S. enterica</i> en carne de pollo	33
Figura 8. Técnica de electroforesis de campos pulsados	34
Figura 9. Esquema para evaluar la resistencia a antibióticos	35
Figura 10. Validación de indicadores de PCR para la confirmación de <i>S. enterica</i> .	39
Figura 11. Análisis filogenético del gen <i>atpD</i> (sector F1 de la ATP sintetasa asociada a membrana, subunidad beta)	41
Figura 12. Prevalencia y diversidad de <i>S. enterica</i> en granjas avícolas.	43
Figura 13. Prevalencia y diversidad de <i>S. enterica</i> en piezas en plantas de procesamiento.	46
Figura 14. Prevalencia y diversidad de <i>S. enterica</i> en pre- y post- <i>chiller</i> .	48
Figura 15. Serotipificación molecular mediante el gen <i>atpD</i> de aislamientos de <i>S. enterica</i> de carne de pollo en puntos de venta.	53
Figura 16. Dendograma de perfiles de campos pulsados y resistencia a antibióticos de 26 aislamientos de <i>Salmonella</i> recuperados de carne de pollo en puntos de venta.	56
Figura 17. Frecuencia (%) de resistencia a antibióticos en cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de carne de pollo en puntos de venta	58

Figura 18. Frecuencia (%) de <i>Salmonella</i> multirresistente aislada de supermercados y mercados públicos	59
Figura 19. Prevalencia de <i>S. enterica</i> en la cadena de producción de carne de pollo.	62
Figura 20. Subtipificación molecular de aislamientos de <i>S. enterica</i> en la cadena de producción de carne de pollo.	64
Figura 21. Diversidad y distribución de <i>S. enterica</i> en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta.	67

I. INTRODUCCIÓN

La carne de pollo es una de las principales fuentes de proteína animal que se consumen a nivel mundial, esto se debe al bajo costo y alta disponibilidad. La producción de carne de pollo es altamente intensiva, con ciclos de producción entre 6 y 7 semanas, y altas densidades poblacionales (aproximadamente 20 aves/m²). Estos factores pueden favorecer la colonización y proliferación de patógenos zoonóticos en las aves (Bailey, 1993). A nivel mundial, autoridades sanitarias han catalogado a la carne de pollo como un vehículo importante en la transmisión de enfermedades gastrointestinales (Park *et al.*, 2014). Esta clasificación del producto ha motivado que autoridades sanitarias centren sus esfuerzos en el estudio de la prevalencia, diversidad y distribución de serotipos de *Salmonella* en la cadena de producción avícola.

La serotipificación de aislamientos es una de las principales herramientas epidemiológicas para la sub-tipificación de *Salmonella*; sin embargo, se han reportado numerosas limitaciones de la técnica. Por ejemplo, se ha identificado que los Laboratorios Nacionales de Referencia, miembros de la Organización Mundial de Salud (OMS), tienen un acceso restringido a anti-sueros para el ensayo de serotipificación (Heriktad, 2002). Se ha evidenciado que el ensayo posee una baja reproducibilidad y nulo poder de resolución para distinguir relaciones fenotípicas o genéticas; además, se requiere un alto costo de inversión en sueros y la necesidad de personal altamente capacitado (Ashton *et al.*, 2016). Para resolver estas limitantes, se han desarrollado ensayos moleculares de genotipificación como la electroforesis de campos pulsados, análisis de multilocus o secuenciación de genomas completos (Achtman *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos países no cuentan con la infraestructura o recursos necesarios para implementar estas técnicas.

Por tal motivo, es necesario desarrollar ensayos moleculares simples y accesibles que permitan la identificación de serotipos para conocer la diversidad, distribución y prevalencia de *S. enterica* (Park *et al.*, 2014). En el presente trabajo se desarrolló y

valido un ensayo de serotipificación molecular basado en la amplificación y secuenciación del gen *atpD*. La implementación de este sistema de clasificación permitió conocer la diversidad de serotipos de *S. enterica* prevalentes en la industria cárnica avícola (granjas avícolas, plantas de procesamiento y puntos de venta). El uso de este sistema de clasificación molecular en la industria productora y procesadora de alimentos permitirá identificar el repertorio de serotipos endémicos en México y establecer un marco de referencia para el desarrollo de programas sanitarios de prevención y control de *S. enterica*.

II. ANTECEDENTES

II.1 Enfermedades gastrointestinales causadas por *S. enterica* a nivel mundial y en México.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema muy grave a nivel mundial, no sólo por los daños causados directamente en la salud de los individuos; sino además, los menoscabos generados para el sector privado y público. En 2011, la OMS estimó que en el mundo fallecieron 1.9 millones de personas a causa de enfermedades diarreicas; sin embargo, no se precisan las causas de este nivel de mortalidad (OMS, 2015). En EE.UU., el Centro de Ciencia para el Interés Público (CSPI, por sus siglas en inglés) reportó que en 2010 ocurrieron 230,000 enfermedades gastrointestinales causadas por alimentos contaminados por microorganismos patógenos y 420,000 muertes. Pocos países cuentan con sistemas de salud integrados que permitan realizar una adecuada vigilancia epidemiológica de *S. enterica*. Majowicz *et al.*, (2010) estimaron que a nivel mundial, 93.8 millones de casos de gastroenteritis al año son causados por infecciones por *S. enterica*, y de estos, 80.3 millones son atribuidos al consumo de alimentos contaminados. Países con sistemas integrales de vigilancia epidemiológica han documentado el grave impacto de los brotes de *S. enterica*. Por ejemplo, en EE.UU., en un período de 6 años (2002 al 2008), se reportaron 3,949 casos clínicos

y 19 defunciones causados por el consumo de alimentos contaminados con *S. enterica*

En México, existe escasa información referente a la prevalencia de salmonelosis en humanos. En el 2016, el boletín epidemiológico de salud reportó 77,614 casos de Salmonelosis no tifoidales (Boletín epidemiológico, 2016). En 2011, Hernández y colaboradores estimaron que anualmente ocurren más de 5 millones de casos de enfermedades gastrointestinales infecciosas en el país; de éstos, alrededor de 120,000 correspondieron a infecciones causadas por *S. enterica* (Hernández *et al.*, 2011). La falta de información a nivel nacional hace difícil establecer medidas de prevención y control para estos patógenos. Por lo cual resulta fundamental establecer programas de vigilancia epidemiológica para determinar la incidencia y prevalencia de *S. enterica* en alimentos y materias primas.

II.1.1 Alimentos como vehículo de *S. enterica*.

En humanos, las infecciones por *S. enterica* constituyen una de las principales causas de diarrea a nivel mundial (Kotzekidou, 2013). Entre los principales alimentos asociados a casos de salmonelosis humana destacan la carne de pollo, res, cerdo, productos lácteos y huevo (Doyle y Beuchat, 2007). En EE.UU., el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) ha reportado una larga lista de brotes de enfermedades gastrointestinales causados por serovariedades de *Salmonella*. En el período comprendido entre 2010 y 2015, se reportaron en EE.UU. 17 brotes causados por el consumo de alimentos contaminados con *S. enterica*, de los cuales el 63% fueron asociados al consumo de productos avícolas (**Cuadro 1**). El consumo de carne de pollo ha sido asociado con graves brotes epidemiológicos a nivel mundial. Datos de la CDC de EE.UU. reportan que entre 1998 y 2008 el consumo de carne de pollo causó el 19% de los 3,264 casos de enfermedades transmitidas por alimentos ocurridos en esa década (CDC, 2013). En el 2009, el Centro Europeo para la Prevención y Control

de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) y las Autoridades de Seguridad Alimentaria Europeas (EFSA, por sus siglas en inglés) reportaron una mayor incidencia de *S. enterica* en carne de pollo (8.7%, n = 30,544) comparado con la incidencia en carne de res (0.7%, n = 83,797). En España, la incidencia de este patógeno en canales de pollo fue de 60% (Carraminana *et al.*, 1997), en Canadá de 61-69% (Lammerding *et al.*, 1988) y en Grecia de 69% (Arvanitidou *et al.*, 1998).

En 2010, la EFSA reportó 99,020 casos confirmados de salmonelosis en humanos (EFSA, 2010). En este mismo año, se reportó que la incidencia de *S. enterica* en carne de pollo (4.8% de positivos) y de pavo (9%) fue más de diez veces mayor que la incidencia en carne de cerdo (0.9%) y de bovinos (0.2%); **(Cuadro 2)**. Estos datos provenientes de EE.UU. y la U.E. sugieren que los productos avícolas son una fuente importante de *S. enterica* para humanos. Sin embargo, en muchos países incluyendo México, la vigilancia epidemiológica de *S. enterica* en productos avícolas es mínima. Por esta razón es de gran importancia establecer un sistema de vigilancia microbiológica a nivel nacional.

Cuadro 1 Brotes de *S. enterica* asociados al consumo de alimentos contaminados en EE.UU.

Año	Alimento vector	Casos de enfermedad reportados	Hospitalizaciones %	# muertes
2015	Carne de pollo	20	30	0
2014	Carne de pollo	634	38	0
2013	Carne de pollo	362	38	0
	Pasta de semilla de sésamo	16	6	1
	Carne de pollo	356	26	0
	Pepinos	84	28	0
	Carne de pollo	22	50	0
2012	Crema de maní	42	28	0
	Mangos	127	26	0
	Melones	261	36	3
	Carne de res	46	26	0
	Carne de pollo	46	28	0
2011	Papayas	106	NR	NR
	Carne de pavo	136	NR	NR
2010	Germinado de alfalfa	140	24	NR
	Huevo	1,939	NR	NR
	Carne de pollo	44	37	0

NR= No Reportado.

Fuente: Datos extraídos del CDC, 2015: Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks.

<https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistateoutbreaks/outbreaks-list.html>

Cuadro 2. Prevalencia de *S. enterica* en productos cárnicos en países de la Unión Europea.

Carne	Número de muestras	% de positivos
Pollo	21,539	4.8
Pavo	4,329	9
Cerdo	69,000	0.9
Bovino	34,236	0.2

Fuente: Datos extraídos del Reporte científico de Autoridades de Seguridad Alimentaria Europeas y Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Europeas, 2013

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991>

II.2 Consumo y producción de carne de pollo.

El consumo de carne de pollo se ha incrementado considerablemente en los últimos 40 años; actualmente la carne de pollo representa el 27% de la carne consumida a nivel mundial (UNA, 2015). En el 2013, el Departamento de Agricultura en EE.UU. (USDA por sus siglas en inglés) y la National Chicken Council, reportaron que entre los años 2005 y 2013, el consumo de carne de pollo fue 1.7 y 1.3 veces mayor que el consumo de carne de cerdo y res, respectivamente (**Figura 1**).

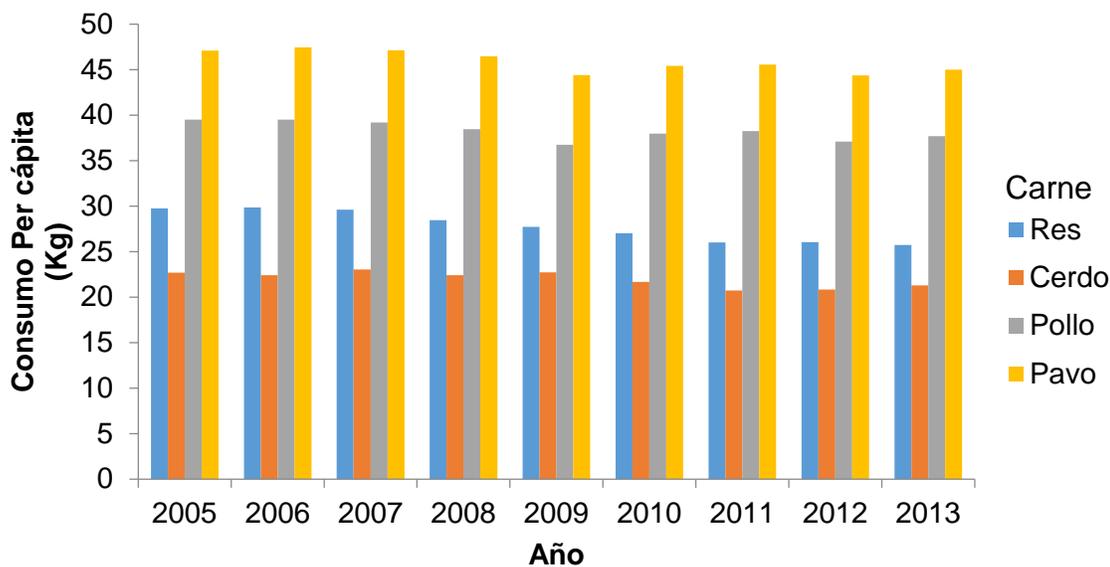


Figura 1. Consumo *per cápita* (Kg) de carne de pollo, res y cerdo entre 2005 y 2013 en EE.UU. Fuente: Datos extraídos de National Chicken Council, 2013.

En 2013, en México, la Unión Nacional Avícola (UNA) reportó que la industria avícola nacional aportó 0.77% en el PIB total, 19.7% en el PIB agropecuario y 40.9% en el PIB pecuario. El sector avícola participó con el 63% de la producción pecuaria; del cual, 35% fue aportado por la producción de pollo (3 millones de toneladas), 28% por la producción de huevo (2 millones de toneladas) y 0.1% por la producción de pavo (9 mil toneladas) (**Figura 2**). Por otra parte, se estimó que para el 2015 el consumo per cápita de carne de pollo fue de 29 kg (UNA, 2013) (**Figura 3**).

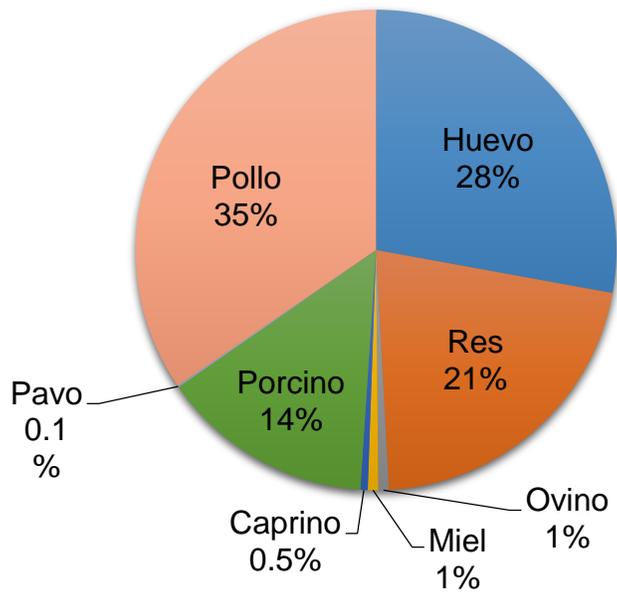


Figura 2. Producción pecuaria en México en 2013. Fuente: Unión Nacional Avícola, 2015.

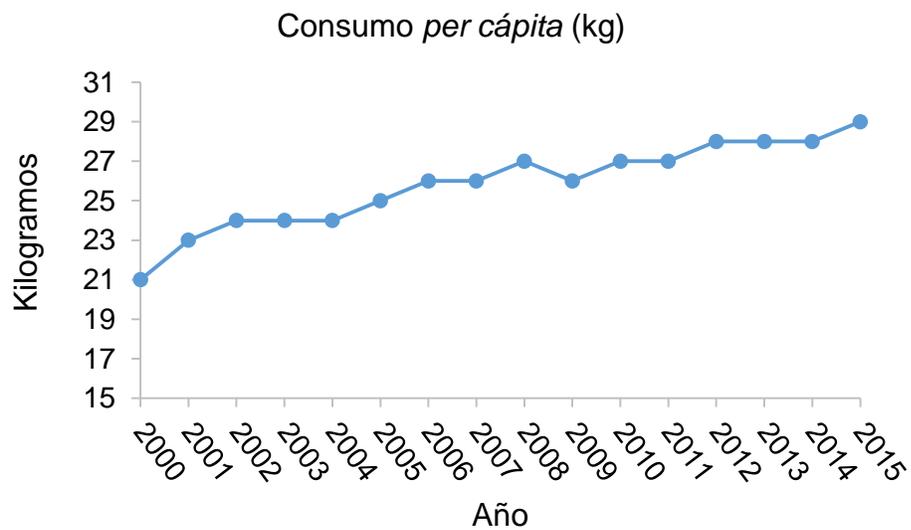


Figura 3. Consumo *per cápita* de carne de pollo en México. Fuente: Unión Nacional Avícola, 2015.

II.3 Prevalencia de *S. enterica* durante la producción de carne de pollo.

II.3.1 Granjas avícolas

El alto número de brotes de salmonelosis en humanos, asociados al consumo de carne de pollo, ha obligado que varios países mantengan una estricta vigilancia de la prevalencia de *S. enterica* en la cadena de producción avícola. La prevalencia de *S. enterica* en parvadas de pollos varía entre 5% y 13% (Lassnig *et al.*, 2012; Voss-Rech *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2016). Se ha demostrado que las estaciones del año, influyen en la prevalencia del patógeno. Por ejemplo, un estudio realizado entre los años 2006 y 2011 por el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS, por sus siglas en inglés) del USDA, reveló que la mayor prevalencia de *Salmonella* Enteritidis en pollos de engorda ocurre durante el invierno (promedio = 1.7%); en contraste, el verano (promedio = 0.94%) es el período del año con la menor incidencia de este patógeno (**Figura 4**). La gran diversidad de fuentes de contaminación en granjas avícolas hace difícil la rastreabilidad del patógeno. Actualmente, se requieren nuevas estrategias microbiológicas que permitan la rápida identificación y distribución de *S. enterica* en las unidades de producción avícola.

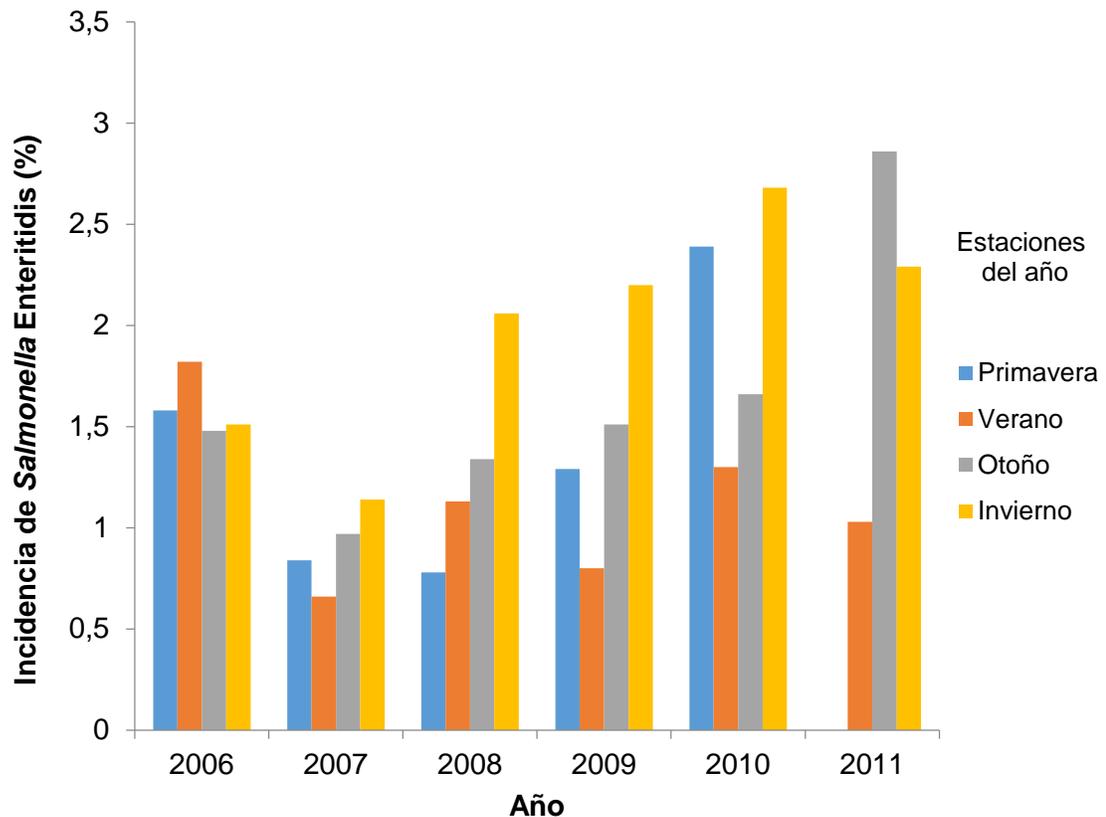


Figura 4. Prevalencia de *Salmonella* Enteritidis en pollos menores de 21 días de edad en diferentes estaciones del año, en EE.UU. Fuente: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2011

II.3.2 Plantas de procesamiento.

La prevalencia de *S. enterica* en las plantas de procesamiento es elevada. Por ejemplo, en los Países Bajos, entre los años 2002 y 2005 se realizó un estudio de prevalencia de este patógeno en plantas de procesamiento. El análisis de 59,495 muestras provenientes de Alemania, Bélgica y Holanda, reveló una prevalencia que oscila entre 28% y 37%. También se observó que la prevalencia de *S. enterica* es proporcional al tamaño de la parvada. Un estudio realizado con 336 canales de pollo provenientes de 6 plantas de procesamiento en España en 2007, reveló que la prevalencia de *S. enterica* fue de 17.9% (Capita *et al.*, 2007). En Brasil, un estudio con 615 muestras demostró que la prevalencia de *S. enterica* fue elevada

en jaulas de transporte (16.7%), cajas (10%), agua de escaldado (16.7%), agua de enfriamiento (6.7%), canales antes de la evisceración (6.7%), canales después del agua de enfriamiento (3.3%) (Reiter *et al.*, 2007). Resultados similares fueron reportados por Berghaus y colaboradores (2013), la prevalencia del patógeno en las aves antes de la evisceración fue del 43% (142/330), antes del enfriamiento (*pre-chiller*) 18.2% y después del enfriamiento 2.4% (8/330) (Berghaus *et al.*, 2013). Estos resultados demuestran que tanto procesos como el eviscerado y el tanque de enfriamiento (*post-chiller*) son puntos críticos que deben ser monitoreados y cuidados para evitar la contaminación cruzada de las canales durante su procesamiento.

II. 3.3 Puntos de venta.

S. enterica es un problema de salud a nivel mundial, debido a esto en diversos países se han realizado estudios de prevalencia en puntos de venta. Sin embargo, la prevalencia de *S. enterica* en pollo varía considerablemente entre países. En parte, por los diferentes métodos microbiológicos utilizados para el análisis. Por ejemplo, Brasil ha reportado una prevalencia de *S. enterica* del 3%; en contraste países como China y Egipto reportan niveles superiores al 30% **(Cuadro 3)**

Cuadro 3. Prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo en puntos de venta a nivel mundial

Positividad a <i>Salmonella</i> (%)							
País	Año	# muestras	Vísceras	Canal	Cuello	Piezas	Referencias
Brasil	2010	76	3	N.A.	N.A.	N.A.	Gumaraes <i>et al.</i> , 2010
Chile	2010	560	0.4	1.8	N.A.	N.A.	Jorge Ulloa, <i>et al.</i> , 2010
EU	2010	714	N.A.	19.8	17.0	N.A.	N.A. Cox, <i>et al.</i> , 2010
Rusia	2012	698	N.A.	N.A.	N.A.	31.5	Waild O <i>et al.</i> , 2012
Canadá	2012	187	N.A.	N.A.	N.A.	31	Angela Cook A., <i>et al.</i> , 2012
Argentina	2013	277	0.72	6.13	N.A.	N.A.	Gabriela <i>et al.</i> , 2013
China	2013	106	N.A.	28	N.A.	N.A.	LiR, <i>et al.</i> , 2010
Egipto	2014	320	N.A.	N.A.	N.A.	1.75	Ashraf M, <i>et al.</i> , 2014

N.A. = No aplica

II.4 Métodos convencionales empleados para la detección de patógenos en los alimentos.

Los métodos convencionales para la detección de patógenos en alimentos han sido utilizados, por muchos años, en laboratorios del sector salud público y privado. La mayoría de estos métodos se basan en la recuperación de bacterias viables a partir de un alimento contaminado.

Las matrices alimentarias pueden contener diferentes microorganismos que compiten por nutrientes y/o generan sustancias que actúan como antimicrobianos. Estos factores influyen en el comportamiento y desarrollo de *Salmonella* en el

alimento (Cox *et al.*, 2011). La combinación de todos estos factores debe tomarse en cuenta para la selección del método de detección del patógeno. Por ejemplo, durante el procesamiento de la carne de pollo, la canal es sumergida en tanques de enfriamiento (*chiller*) con agua clorada a 50 ppm (Tsai *et al.*, 1995), este paso puede inducir estrés o dañar a las células lo que dificulta la detección del patógeno en el laboratorio. A pesar del reconocimiento de estos inconvenientes, no existe una metodología estandarizada para la detección de este patógeno en carne de pollo (Cox *et al.*, 2011). En general, el análisis de las muestras consiste del pre-enriquecimiento, enriquecimiento, selección e identificación. Para la identificación del patógeno, convencionalmente se realizan pruebas bioquímicas y serológicas (Kaniga *et al.*, 1995; EFSA, 2010; Burfoot *et al.*, 2011; EFSA, 2015). Sin embargo, en los últimos años se ha implementado la identificación a través de ensayos moleculares (Liu *et al.*, 2002; Hoorfar, 2011; Bell *et al.*, 2016).

Existe una amplia gama de protocolos de aislamiento e identificación de *S. enterica* (**Cuadro 4**). Un estudio publicado por Waltman y Mallinson (1995) reportaron una extensa variabilidad en los protocolos de aislamiento de *S. enterica* en 64 laboratorios que participan en el Plan Nacional de Mejoramiento Avícola de EE.UU. Específicamente, el estudio reveló que se utilizan 17 diferentes medios de enriquecimiento y 14 medios selectivos. Además, el 55% de los laboratorios incubaba las muestras en un rango de 35 a 37 °C, mientras que el 45% restante, las incubaba en un rango 38 a 42 °C. También se reveló que el 51% de los laboratorios incubaba los caldos de enriquecimiento por 24 h, mientras que el 28% los incubaba por 48 h. (Waltman y Mallinson, 1995).

Cuadro 4. Diversidad de medios de cultivo para la detección de *Salmonella* en diferentes países.

País	Pre-enriquecimiento	Enriquecimiento	Medios de cultivo selectivo	Referencia
Argentina	APB	TT	XLD y BGA	Favier, <i>et al.</i> 2013
Bélgica	B.H.I	TT	BGA y SS	Uyttendaele, <i>et al.</i> , 1998
Brasil	APB	TT y RV	XLT-4, BGA y Rambach	Worcman, <i>et al.</i> , 2000
China	APB	TT y RV	XLT-4 y MacConkey	Wang, <i>et al.</i> 2013
Corea	APB	TT y RV	XLD y BGA	Ran-Hee, <i>et al.</i> 2014
Dubái	APB	RV	HE y LB	Munawwar, <i>et al.</i> 2010
Egipto	APB	RV	XLD	Ahmed & Shimamoto, 2014
Guatemala	APB	TT	BGA, XLD.	Jarquín , 2015.
Hungría	APB	RV	XLD	Nógrády <i>et al.</i> , 2008
Irlanda	APB	RV	BGA	Whyte <i>et al.</i> , 2002.
Reino Unido	APB	TT	XLD	Harrison, <i>et al.</i> 2001
Rumania	APB	TT y RV	XLD y Rambach	Dan <i>et al.</i> , 2014
Irán	APB	SC	BGA y SS	Hamid Reza, <i>et al.</i> 2015

APB: (agua peptonada buferada), TT (caldo tetrato), RV (caldo Rappaport Vassiliadis), SC (caldo selenito-cisteína), BGA (agar verde brillante), HE (agar Enterico Hektoen), XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato), SS (agar Salmonella-Shigella)

II.5 Análisis moleculares para la detección y caracterización de *Salmonella* en alimentos

En la actualidad, la identificación de *S. enterica* se lleva a cabo a través de ensayos moleculares dirigidos a la amplificación de genes específicos del género (Liu *et al.*, 2002; Malorny *et al.*, 2004a; Hoorfar, 2011; Søborg *et al.*, 2013; Park y Ricke, 2015). Algunos de estos ensayos se han convertido en estándares internacionales para la identificación del patógeno (Malorny *et al.*, 2003a; Malorny *et al.*, 2003b; Malorny *et al.*, 2004a). Dentro de estos ensayos destacan el uso de los genes *invA*, *ttr* y *16S rRNA*.

Gen *invA*

La invasión en células eucariotas es uno de los pasos esenciales en el ciclo de vida de un gran número de microorganismos patógenos (Galán y Curtiss, 1991). Existe una gran variedad de serotipos de *Salmonella* que pueden causar enfermedad en diferentes huéspedes, algunos serotipos como *S. Typhi*, *S. Gallinarum* están adaptados a un hospedador en particular, mientras otros como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* pueden causar enfermedad en una gran variedad de huéspedes (Galan *et al.*, 1992). Sin embargo, tienen una característica patogénica en común, la cual es la habilidad de invadir células del epitelio intestinal (Galan *et al.*, 1992). El gen *invA* es el primer gen del operón *invABC* en el cromosoma de *Salmonella* que además de proveerle ciertas habilidades para entrar a las células epiteliales del intestino, es un gen esencial para la invasión del fenotipo de *S. Typhimurium* (Galan *et al.*, 1992). Galán y colaboradores en 1992 realizaron un estudio sobre la invasión en células epiteliales con cepas de *Salmonella* construidas con mutaciones no polares en el gen *invA*. Los resultados mostraron que las cepas mutadas no modificaron la arquitectura normal de las microvellosidades de las células epiteliales y no causaron alteraciones en la distribución de los microfilamentos de actina en las células infectadas; observándose efecto contrario con cepas no mutadas de *S. Typhimurium* (Galan *et al.*, 1992). Los estudios

anteriores demuestran que el gen *invA* es esencial para la invasión de *Salmonella* en células epiteliales; por lo tanto es un buen blanco para la detección específica de este género bacteriano. En el 2003, se propuso el uso de este gen como un marcador molecular estándar para la identificación de *Salmonella* en muestras clínicas y ambientales (Malorny *et al.*, 2003b).

Gen *ttr*

Un determinado rango de bacterias tiene la capacidad de utilizar al tetrionato como un aceptor final de electrones, esta capacidad es responsabilidad de locus *ttRSBCA*. En *Salmonella* los genes *ttr* están localizados dentro de la isla de patogenicidad 2, cuya función es la expresión de la enzima tetrionato reductasa (Barrett y Clark, 1987). Esta habilidad diferencial, es explotada a nivel de laboratorio, cuando el caldo tetrionato es utilizado para el enriquecimiento de especies de *Salmonella*. Cuando el tetrionato está completamente reducido en el medio, la bacteria puede utilizar el tiosulfato producido como un aceptor adicional de electrones (Hensel *et al.*, 1999). Malorny y colaboradores (2004), realizaron un estudio para la detección e identificación de *Salmonella* en matrices alimentarias mediante la amplificación del gen *ttr*, los resultados revelaron la correcta identificación de 110 cepas de *Salmonella*, y la alta especificidad no amplificando 87 cepas diferentes de *Salmonella* (Malorny *et al.*, 2004a).

Gen *16S rRNA*

El gen *16S rRNA* es esencial en el proceso de iniciación de la traducción. La interacción de la secuencia Shine-Delgarmo del *16S rRNA* con el mRNA permite el ensamblaje del complejo ribosomal (Jacob *et al.*, 1987). A partir de los estudios de Woese y Fox (1977), este gen ha sido la base taxonómica para la identificación bacteriana (Woese y Fox, 1977). Este marcador filogenético es una excelente herramienta genética para identificar y caracterizar poblaciones bacterianas (Janda, 2007). Entre las características de este gen, resaltan: i) está altamente conservado a nivel de género y especie, ii) está presente en operones lo cual aumenta el número de copias presentes en el genoma, iii) su tamaño permite secuenciar el gen en su totalidad (1,500 pb), iv) además la caracterización filogénica de este gen está altamente asociada a los perfiles bioquímicos característicos entre cada especie (Janda, 2007). El empleo de este marcador genético puede ayudar a discriminar más escrupulosamente entre bacterias que fueron identificadas pobremente con métodos fenotípicos (Clarridge, 2004). Por ejemplo, un estudio con 177

aislamientos bacterianos difíciles de identificar por métodos convencionales se sometieron al análisis del gen *16S rRNA*. Este trabajo demostró que el ensayo molecular permitió la identificación, a nivel de género y especie, del 89% de estos aislamientos; en contraste, sólo 42% de estos microorganismos pudo ser identificado con el uso de perfiles bioquímicos. Los resultados de este estudio claramente indican que el uso del gen *16S rRNA* permite realizar una identificación más robusta, reproducible y precisa que la obtenida por las pruebas fenotípicas (Drancourt *et al.*, 2000).

II.6 Métodos para la tipificación de *Salmonella*.

*Serotipificación convencional de *Salmonella enterica**

Por más de 80 años, la vigilancia epidemiológica de *Salmonella* se ha llevado a cabo a través de métodos serológicos aprovechando las variaciones en los antígenos de superficie del patógeno (Henriksen, 1978). Esta metodología está basada en la identificación serológica de los antígenos O (somático) y H (flagelar). El antígeno O determina el serogrupo, mientras que el antígeno H es complementario para definir el serovar o serotipo del aislamiento (Liu *et al.*, 2014). Según el esquema descrito por Kauffman-White-Le Minor, existen 46 serogrupos y 114 antígenos H en *Salmonella enterica*, obteniéndose más de 2,500 serotipos como resultado de las diferentes combinaciones de antígenos (Grimont y Weill, 2007). Los genes responsables de la expresión del antígeno O son *wzx* y *wzy*, localizados en el regulon *rfb* (Samuel y Reeves, 2003). Mientras que la expresión del antígeno H está dada por los genes *fliC*, que codifica la fase I de la flagelina y el gen *fljB* de la fase II (McQuiston *et al.*, 2004).

La identificación de los serotipos endémicos de *S. enterica* es una de las prioridades de salud a nivel mundial (Wattiau *et al.*, 2011). La OMS monitorea la distribución de serotipos a través del programa *WHO Global Salm-Surv*. Este sistema genera un reporte anual de los 15 serotipos más frecuentemente aislados

de cada país (Galanis *et al.*, 2006; Hendriksen *et al.*, 2009b). El serotipo más prevalentes es Enteritidis, causando el 85% de los casos de Salmonelosis reportados en la U.E., 38% en Asia y 31% en América Latina y el Caribe (Galanis *et al.*, 2006). También, estos sistemas de vigilancia permiten identificar serotipos restringidos a una región geográfica; por ejemplo, S. Marina, S. Tilene y S. Weltevreden que circulan principalmente en Sudamérica, África y Asia (Mermin *et al.*, 1997).

Por lo anterior, agencias gubernamentales nacionales e internacionales han establecido sistemas de vigilancia de *Salmonella* basados en la serotipificación convencional (Moreno Switt *et al.*, 2009). Sin embargo, este sistema tiene algunos inconvenientes. Por ejemplo, en el 2000 la OMS inició un sistema de aseguramiento de calidad interno de los laboratorios de referencia (EQAS, por sus siglas en inglés) para la serotipificación de *Salmonella* (Hendriksen *et al.*, 2009a). En los análisis de desempeño entre el 2000 y 2007, participaron 189/249 (76%) de laboratorios nacionales de referencia en 96 países; de este total, sólo el 84% realizó una correcta serotipificación de los aislamientos proporcionados. Los principales errores fueron asociados a la mala calidad de los sueros (Hendriksen *et al.*, 2009a). Otros inconvenientes de la serotipificación incluye la baja reproducibilidad del ensayo, una elevada inversión económica para adquirir y reemplazar la amplia gama de sueros y la necesidad de personal altamente calificado para realizar el ensayo (Ashton *et al.*, 2016). Complicaciones similares han sido reportadas en ensayos de serotipificación *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* entre otros (Datta *et al.*, 2013; Magomani *et al.*, 2014; Clotilde *et al.*, 2015). En conjunto, estos resultados resaltan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la serotipificación de *S. enterica*.

Serotipificación molecular

Diversos grupos de trabajo han desarrollado sistemas de serotipificación molecular como una alternativa para solucionar las limitantes de la serotipificación convencional. Estos métodos aprovechan las ventajas de las herramientas

moleculares y conservan la nomenclatura internacionalmente aceptada del sistema Kauffmann-White (Duarte Martinez *et al.*, 2010). La serotipificación molecular se basa en el análisis de marcadores genéticos asociados a serotipos (Wattiau *et al.*, 2011). Por ejemplo, el método propuesto por Kim y colaboradores (2006) se basa en la amplificación de 12 genes serotipo-específicos que permite la identificación de los 28 serotipos más relevantes clínicamente en los EE.UU. (Kim *et al.*, 2006).

Otros ensayos de serotipificación molecular se basan en el análisis de los genes que codifican para el antígeno O (*wzx* y *wzy*) y estructuras flagelares del antígeno H (*fljB* y *fliC*). Con un ensayo de PCR multiplex se puede identificar el 85% de los serotipos más prevalentes en EE.UU. (Echeita *et al.*, 2002; Herrera-Leon *et al.*, 2007). También, se han utilizado genes constitutivos para la identificación de serotipos. Por ejemplo, un estudio preliminar con el gen *atpD* realizado por Christensen y colaboradores (1998) reveló que la capacidad para distinguir 11 serotipos de *S. enterica* (Christensen y Olsen, 1998). Por otro lado, el análisis del gen *rpoB* permitió la identificación de 33 serotipos de *Salmonella* (Seong *et al.*, 2012).

Por su naturaleza, la serotipificación molecular permite la identificación de cepas difíciles de tipificar mediante la serología convencional. Por ejemplo, las cepas rugosas que han perdido el antígeno O y no expresan los antígenos flagelares H (Hoorfar *et al.*, 1999). En este sentido, la secuenciación de la región variable del gen *fliC* permitió la serotipificación de 96 cepas problemáticas (Sonne-Hansen y Jenabian, 2005). Finalmente, estos ensayos son más reproducibles, rápidos y económicos para ser implementados en laboratorios regionales y nacionales.

Electroforesis de Campos pulsados (PFGE)

Uno de los principales objetivos del estudio de los brotes de enfermedades es identificar la fuente de contaminación y la relación genética entre los diferentes aislamientos obtenidos a partir de alimentos contaminados (Stevens *et al.*, 2008). Para alcanzar este objetivo, existen una amplia gama de herramientas

epidemiológicas. El método de Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) es una herramienta molecular catalogada como el método de referencia para la genotipificación de *Salmonella* (Cardinale *et al.*, 2005; Harbottle *et al.*, 2006). Esta metodología consiste en el análisis de fragmentos del ADN generados por la digestión con enzimas de restricción a partir del genoma completo. Estos son sometidos a una electroforesis, cuya característica principal es la separación electroforética en más de una dirección mediante el empleo de tres pares de electrodos (Murase *et al.*, 1995). La endonucleasa *XbaI* ha sido considerada como la enzima estándar para la caracterización de aislamientos de *Salmonella* (Harbottle *et al.*, 2006).

Los PFGE han sido empelados para la identificación de poblaciones clonales de patógenos aislados de matrices alimentarias. Por ejemplo, un estudio con carne de res realizado por Stevens y colaboradores (2008), reveló la existencia de 1 a 6 perfiles genéticos en cada uno de los serotipo analizados (Bredeney, Muenster, Waycross, Corvallis, Kentucky y Brandenburg) (Stevens *et al.*, 2008). Otro ejemplo de la diversidad entre serotipos de *Salmonella* fue publicado por Freni y colaboradores (2013), analizaron los perfiles genéticos de 45 cepas de *Salmonella* de diferentes serovariedades (Enteritidis, Kentucky, Anatum, London, Irenea, Pooa, Brancaster) procedentes tres matrices alimenticias (aves, almejas y leche de vaca). El análisis reveló 13 grupos genéticos, donde la mayor heterogeneidad fue observada principalmente en los serovares Enteritidis y Kentucky. Específicamente 52.7% (19/36) de aislamientos de *S. Enteritidis* fueron agrupados en dos linajes genéticos; mientras que el 47.2% (17/36) de los aislamientos de Kentucky fueron distribuidos en seis grupos genéticos (Fendri *et al.*, 2013). Este resultado revela la gran diversidad genética entre aislamientos del mismo serotipo. Por lo tanto, es fundamental establecer nuevas y/o adicionales metodologías de tipificación para la rastreabilidad de *S. enterica*.

Perfil de resistencia a antibióticos

Los genomas bacterianos son estructuras compuestas por una amplia variedad de genes. Los genes presentes en la mayoría de los miembros de un taxón se denominan “genoma central”; mientras que los genes variables en los miembros de un taxón se clasifican como “genes accesorios”. Genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos son parte del repertorio de genes accesorios (Wiesner *et al.*, 2009). La resistencia a antibióticos es una cualidad adaptativa generada por presión selectiva. En este contexto, los aislamientos que circulan en unidades de producción animal adquieren genes de resistencia para sobrevivir a exposición de antibióticos usados como promotores de crecimiento (Antunes *et al.*, 2003; de Oliveira *et al.*, 2005; Robicsek *et al.*, 2006; Nde y Logue, 2008; Huehn *et al.*, 2010). Por lo tanto, el perfil de resistencia a antibióticos es una herramienta de tipificación fenotípica para aislamientos de *Salmonella*. (Chen *et al.*, 2004; Soyer *et al.*, 2013)

II.7 Rastreabilidad de microorganismos patógenos mediante análisis genómicos comparativos.

Las técnicas de secuenciación genómica son útiles en la rastreabilidad, vigilancia y control de patógenos gastrointestinales (Baker *et al.*, 2010). Los avances en la secuenciación de ADN permiten un rápido análisis del genoma, exhibiendo la diversidad genética que puede existir entre los microorganismos patógenos (MacLean *et al.*, 2009). Esta herramienta posee un gran poder de resolución para el estudio de la epidemiología y la diversidad de las poblaciones bacterianas. Por ejemplo, el surgimiento de brotes infecciosos causados por dos haplotipos de *S. Typhi* con genotipo idéntico, pero localizados en dos áreas geográficas distantes podría ser un indicador de una posible pandemia (Baker *et al.*, 2010).

Otro ejemplo de las ventajas del uso análisis genómicos en la rastreabilidad molecular en patógenos, lo ilustra un brote de enfermedad suscitado en Alemania

en mayo del 2011. En este evento, se reportaron 830 casos de síndrome urémico hemolítico y 46 muertes causados por *E. coli* O104:H4 (Mellmann *et al.*, 2008). La secuenciación del genoma de este patógeno reveló que la cepa aislada de *E. coli* O104:H4, correspondía a una nueva variante patogénica. Esta nueva cepa adquirió genes de virulencia de cepas enteroagregativas y enterohemorrágicas, a través del proceso de transmisión horizontal de genes. Este proceso aumentó considerablemente su patogenicidad (Mellmann *et al.*, 2008). Interesantemente, por primera vez en la historia de la microbiología, el genoma de este patógeno se secuenció en tan solo una semana, permitiendo identificar regiones génicas únicas. Este hallazgo permitió el desarrollo de un ensayo molecular altamente específico, capaz de detectar al patógeno en dos horas (Mellmann *et al.*, 2008).

El uso de análisis genómicos comparativos también puede facilitar el desarrollo de estrategias para la prevención y control de enfermedades zoonóticas. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, un patógeno recurrente en humanos asociado a enfermedades nosocomiales, también es uno de los principales patógenos en la industria avícola (Lowder *et al.*, 2009). Estudios genómicos comparativos de cepas patógenas de *S. aureus* aisladas de ovinos, bovinos, aves silvestres, pollo de engorda y humanos, revelaron que de los aislamientos de humanos y pollos de engordan pertenecen al mismo linaje genético. Este resultado apoya la hipótesis del surgimiento de nuevos linajes de patógenos adaptados a hospedadores específicos (Lowder *et al.*, 2009). Esta información genera un nuevo paradigma del posible impacto de la interacción hombre-animales en el surgimiento de nuevos patógenos (Lowder *et al.*, 2009).

En este mismo contexto, en el Reino Unido, se realizó un estudio genómico utilizando Análisis de Secuencia Multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés). En este trabajo se analizaron 1,231 aislamientos de *Campylobacter* y 1,145 aislamientos de *Campylobacter jejuni* provenientes de diferentes especies animales: pollo de engorada (n = 515), bovinos (282), ovejas (160), cerdos (30), aves silvestres (44), conejos (20); y aislamientos ambientales (94). Los resultados

del estudio revelaron que el 96% de los aislamientos provenientes de humanos están genéticamente relacionados a aislamientos que circulan en animales en producción; 56% con cepas que circulan en la industria avícola y 35% en ganado bovino (Wilson *et al.*, 2008).

Estas tecnologías moleculares de rastreabilidad también se han empleado en casos estudios epidemiológicos de *S. enterica*. Por ejemplo, en Nepal, se analizaron 62 cepas de *S. Typhi*, las cuales fueron aisladas a partir de muestras pediátricas durante un período de 20 meses. El análisis del genoma de estas cepas reveló que la mayoría (68%) de los aislamientos surgieron de un sólo linaje; indicando que el agente causal podría provenir de una sola fuente de contaminación (nicho ecológico) (Holt *et al.*, 2010).

Otro ejemplo del potencial de los ensayos moleculares para la efectiva rastreabilidad de *S. enterica* fue demostrado en un estudio realizado por la Universidad de Pensilvania en 2011. En este trabajo se caracterizaron 167 aislamientos de *S. Enteritidis* (35 provenientes de humanos, 46 de pollos, 24 de huevos, y 63 de muestras ambientales). Mediante estudios genéticos comparativos se encontró que la mayoría, 66% de los aislamientos se agruparon en el linaje genético humanos-pollos-huevos; indicando que las bacterias que circulan en la industria avícola podrían ser la causa de infección en humanos (Liu *et al.*, 2011). Estos ejemplos claramente demuestran el potencial de los ensayos moleculares para la rastreabilidad del nicho ecológico de microorganismos patógenos en la cadena de producción de los alimentos.

III HIPÓTESIS

La identificación de marcadores moleculares con polimorfismos asociados al serotipo permitirá el desarrollo de ensayos moleculares orientados a identificar la diversidad y distribución de *S. enterica* en la industria avícola

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución y diversidad genética de *S. enterica* en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta de productos cárnicos avícolas, a través del uso de un marcador molecular.

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar ensayos moleculares para determinar la variabilidad genética de *S. enterica*.
2. Conocer la prevalencia de *S. enterica* en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta de carne de pollo.
3. Conocer la diversidad de serotipos de *S. enterica* presentes en la industria avícola mexicana.
4. Establecer una base de datos genética de los serotipos de *S. enterica* que circulan en la industria avícola mexicana.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Materiales

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)

Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)

Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)

Bolsas de poli-papel en rollo sin marca comercial diferentes tamaños

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Centrifuga de mesa (HermLe)

Homogenizador (Stomacher, Seward 400)
Horno para esterilización (Shel-lab)
Incubadora de 35° (Pecision Scientific, Seward 400)
Microscopio luminoso (Leica)
Potenciómetro óptico (Jenway), modelo 3510
Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)
Micropipetas 2-1000 µl (Labsystems)
Termociclador modelo c1000 touchcycler de 96 well marca Bio-rad
Mini sistema de electroforesis horizontal. Marca. Bio-rad.
Termociclador tiempo real de alta capacidad (formato de 96-pozos). Modelo CFX96touch™ real-time PCR detectionsystem, marca bio-rad

V.1.1 Medios de cultivo

Agar Base Sangre (ABS), (BD Bioxon)
Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), (BD Bioxon)
Agar soyatripticasa (AST), (BD Bioxon)
Caldotetrionato (CTT), (BD Bioxon)
CaldoRappaportVassiliadis (CRV), (BD Bioxon)
Caldo soya tripticasa (CST), (BD Bioxon)
Caldo urea, (BD Bioxon)
Novobiocna (SIGMA-ALDRICH)

V.1.2 Soluciones

Agua peptonada bufferada al 1% (Peptona de carne, BD Difco; Fosfato de sodio heptahidratado, Fosfato de potasio, Karal)
Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (cloruro de sodio, Productos Químicos Monterrey).
Solución Yodo-yoduro

V.1.3 Reactivos

Reactivos para PCR: MgCl₂, 10X taq Buffer, dNTP, Taq Hot Start

V.1.4 Material biológico

Salmonella Typhimurium ATCC 14028.

Salmonella Agona.

Salmonella Montevideo.

Citrobacter spp.

Muestras de canales de pollo y unidades de producción avícola provenientes de la zona norte, centro y sur del país.

V.2 Métodos

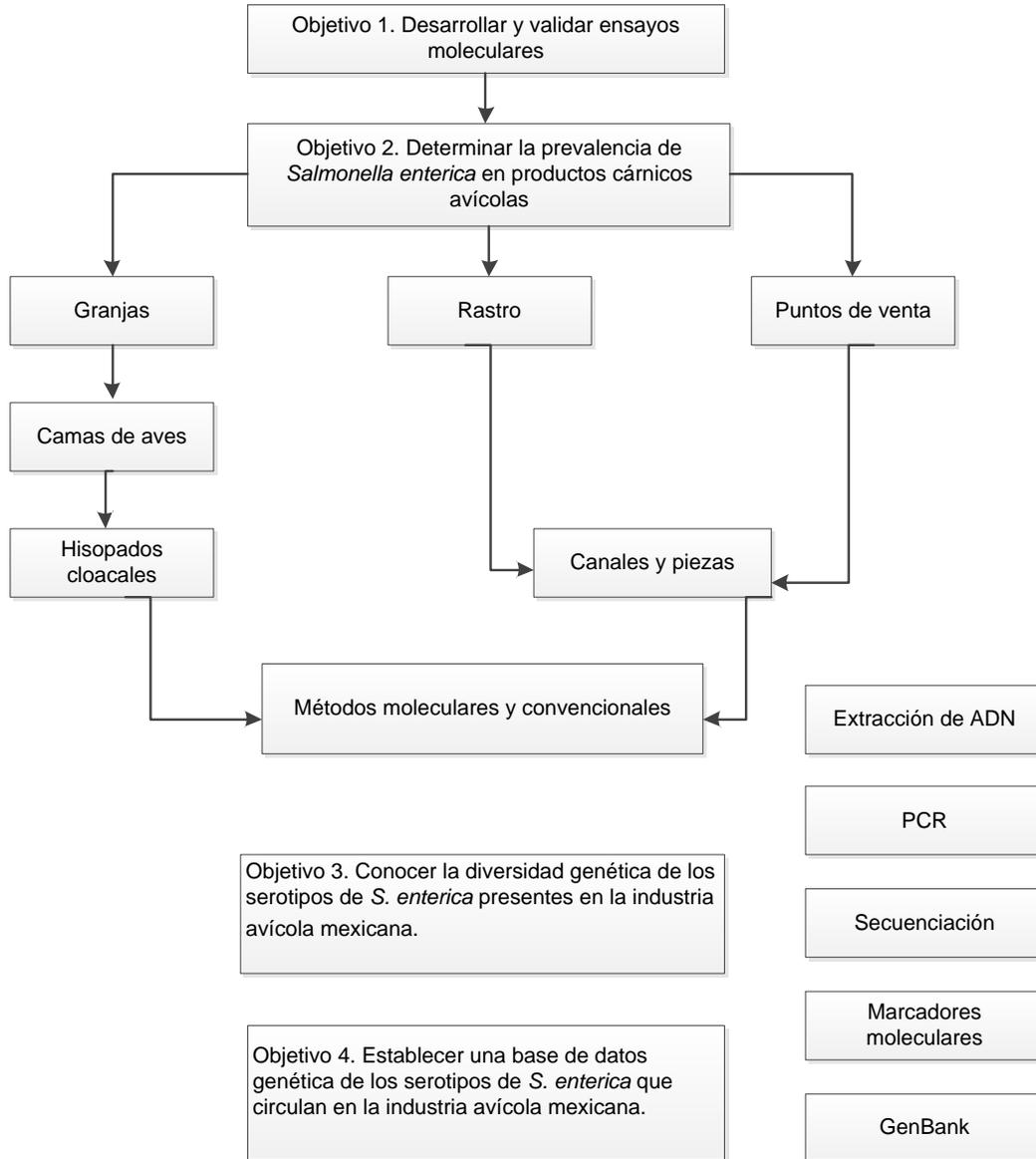


Figura 5. Estrategia experimental para determinar la distribución y diversidad de *S. enterica* en la producción avícola. La primera fase (objetivo 1) de esta estrategia consistió en desarrollar ensayos moleculares que sean altamente específicos, reproducibles y sensibles para la detección de *S. enterica* en muestras ambientales y aislamientos bacterianos. En la segunda fase (objetivo 2), se utilizaron estas metodologías moleculares y convencionales para determinar la frecuencia de estos patógenos en la industria avícola. En la tercera fase (objetivo 3), se determinó la diversidad genética y distribución de los patógenos. Finalmente (objetivo 4) Se

estableció una base de datos genética de los serotipos de *S. enterica* que circulan en la industria avícola mexicana

V.2.1 Validación de ensayos moleculares para la identificación de *S. enterica*.

- a) **Extracción de ADN:** Los aislamientos presuntivos a *Salmonella* fueron activados en caldo soya tripticaseína, se tomó 1 mL del cultivo posteriormente se centrifugo a 13,000 rpm/8min para la formación de un pellet el cual se sometió a una extracción de ADN genómico mediante el kit comercial Quick-gDNA™Miniprep.
- b) **Validación de iniciadores de la PCR:** para evaluar la especificidad de los iniciadores, se realizó la extracción de ADN de cepas de *S. enterica* provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro, este material se utilizó para ensayos de PCR usando los iniciadores descritos en el **(Cuadro 5)**. La especificidad de los iniciadores se evaluó usando controles positivos (cepas blanco del iniciador; *Salmonella*) y controles negativos (cepas no blanco del iniciador, *Citrobacter*). La especificidad de productos amplificados fue evaluada mediante electroforesis usando geles de agarosa a 1.5%. Posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en el fotodocumentador Bio-Imaging System, MiniBis Pro, Dnr.
- c) **Confirmación molecular de aislamientos.** Se realizó la amplificación de dos genes específicos de *S. enterica*., *invA* y *16S rRNA* (*Liu et al., 2002*), (*Søborg et al., 2013*). Cada reacción de PCR consistió de: 10 X PCR Buffer, 1.36 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.34 µL dNTPs (0.2 mmol), 0.085 µL (1.25 U/ µL) de Taq Maxima Hot Start (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.68 µL de cada primer (10 mmol) y 2 µL de ADN. Las condiciones de la PCR para el gen *invA* fueron: *desnaturalización* 94°C por 3 min y 35 ciclos de 94°C x 30s, 57. 4°C x 30s y 72°C x 30s) con una extensión final de 72°C, 5 min. Para el gen *16S rRNA*: *desnaturalización* 94°C por 3 min y 32 ciclos (94°C x 20s; 53°C x 30s, 72°C x 30s) con una extensión final de 72°C x 2 min

Cuadro 5. Pares de iniciadores para la amplificación de *S. entérica*

Gen	Iniciadores	Autores	Número de veces citado
<i>invA</i>	invA139:GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA	Malorny, <i>et al.</i> , 2012	405
	invA141:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>16SrRNA</i>	invA-1: CTGTTGAACAACCCATTTGT	Liu, <i>et al.</i> , 2002	38
	invA-2: CGGATCTCATTAATCAACAAT		
	16SF1: TGTTGTGGTTAATAACCGCA	Li y Tsen, 1995	80
	16SIII: CACAAATCCATCTCTGGA		
<i>ttr</i>	MINf: ACGGTAACAGGAAGMAG	Soborg <i>et al.</i> , 2013	2
	MINr: TATTAACCACAACACCT		
	ttr-6:CTCACCAGGAGATTACAACATGG	Malorny, <i>et al.</i> , 2004	331
	ttr-4:AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC		

V.2.2 Desarrollo y validación de un ensayo para la serotipificación molecular basado en la secuenciación del *atpD*.

Secuenciación Sanger de productos de la PCR.

Los productos obtenidos de la amplificación del gen *atpD* fueron enviados al laboratorio especializado en secuenciación Sanger en GENEWIZ en EE.UU. La metodología consiste en utilizar una de las cadenas del ADN proveniente de los plásmidos como plantilla para una polimerización usando dideoxinucleótidotrifosfato (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Estos nucleótidos carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', por lo que la reacción es detenida con su incorporación. Las nuevas cadenas de ADN generadas serán de distintas longitudes, debido a la incorporación del dideoxinucleótido. Finalmente los productos son analizados a través de una electroforesis capilar para obtener la secuencia de cada nucleótido de la cadena de

ADN (Sanger, Coulson, 1975). Estas reacciones se llevaran a cabo en un sistema Big Dye Terminator chemistry (versión 2.0) de Applied Biosystems usando un secuenciador capilar ABI 3730XL (De Santis *et al.*, 2006).

V.2.3 Muestreos en granjas avícolas

Los muestreos se realizaron utilizando metodologías previamente validadas y estandarizadas para el análisis de la prevalencia de patógenos en granjas avícolas (**Figura 6**). Se realizaron muestreos en tres granjas (A, B y C) en los meses de abril, mayo y octubre del 2016. En total, se obtuvieron 122 muestras de camas de las aves. Para la colección de estas muestras, se emplearon botas quirúrgicas estériles previamente humedecidas con S.S.I., las cuales se utilizaron para caminar sobre la cama de las aves aproximadamente 100 m., posteriormente las botas impregnadas del material se colocaron en bolsas de polietileno estériles (Williams *et al.*, 2008), se mantuvieron a 4 °C durante su traslado (~ 2 h) y posterior análisis microbiológico en el laboratorio.

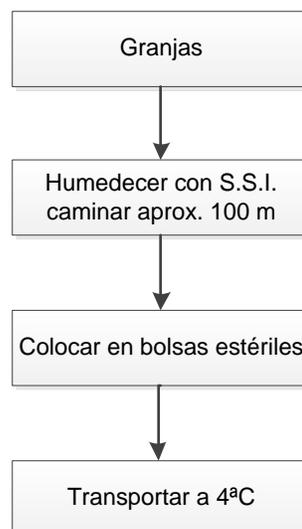


Figura 6. Estrategia para determinar la prevalencia de *S. enterica* en granjas avícolas.

V.2.4 Muestreo en plantas de procesamiento.

Se realizaron seis muestreos durante el mes de Agosto 2016 en diferentes áreas de la planta de procesamiento *pre-chiller*, *post-chiller* y de corte. Se realizaron enjuagues de 152 canales en total con 400 mL de agua peptonada buferada por 1 min. Los lavados fueron almacenados a 4°C y transportados inmediatamente al laboratorio. También se recolectaron 180 piezas en total de cada uno de los siguientes cortes: pechuga (36), ala (36), pierna (36), cuello (36) y molleja (36), cada muestra se colocó en bolsas de plástico, se mantuvieron a 4 °C durante (~1 h) para su traslado y posterior análisis en el laboratorio (Burfoot *et al.*, 2011)

V.2.5 Muestreos en puntos de venta

Se colectaron **1,254** cuellos de pollo provenientes de mercados públicos y supermercados ubicados en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco Querétaro, Puebla, Veracruz. Los muestreos fueron realizados entre marzo-abril del 2015, las muestras fueron almacenadas ~4 °C durante su traslado (tiempo máximo 6 h) en hieleras para su posterior análisis microbiológico en el laboratorio.

V.2.6 Aislamiento y detección de *S. enterica*

Análisis microbiológico. El análisis se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos por las autoridades sanitarias de la Unión Europea y EE.UU. (Burfoot *et al.*, 2011) (**Figura 7**). Este procedimiento consiste de tres pasos, pre-enriquecimiento, enriquecimiento, selección y confirmación molecular. 1) Pre-enriquecimiento: a las muestras de cama, piezas (cuellos, pechugas, alas, piernas, cuellos, mollejas) y canal se adicionaron 100, 225 y 400 mL de agua peptonada bufferada; respectivamente. Las muestras fueron incubadas por 24 h a 35 °C. 2) Enriquecimiento: cada muestra pre-enriquecida fue inoculada en caldo Rappaport Vassiliadis (100 µL) y Tetratonato (1,000 µL) e incubada a 43 °C y 35 °C, respectivamente por 24 h. 3) Selección: los caldos de enriquecimiento fueron sembrados en medio solido de Xilosa Lisina Desoxicolato suplementado con

novobiocina (0.001% w/v). Las colonias con morfología sospechosa a *Salmonella* fueron purificadas, una vez obtenidos los aislamientos fueron sometidos a la reacción de urea; los aislamientos negativos a esta prueba fueron sometidos a ensayos de PCR para su confirmación. El análisis de los porcentajes de la prevalencia en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta, se realizó mediante la transformación a la raíz cuadrada del arco-seno (Warton y Hui, 2011).

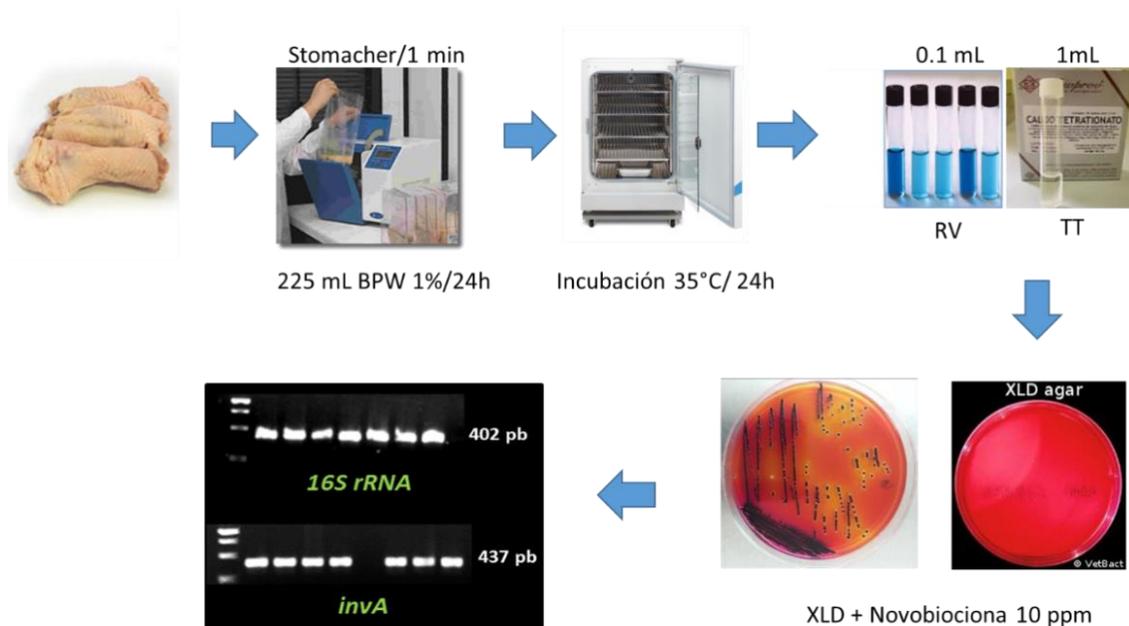


Figura 7. Estrategia general para el aislamiento de *S. enterica* en carne de pollo

V.2.7 Caracterización de aislamientos de *S. enterica*.

Electroforesis de campos pulsados (PFGE).

Se prepararon bloques de ADN de acuerdo a la metodología establecida por Tenover (1995). La digestión del ADN genómico se realizó con 10 U de la enzima endonucleasa *XbaI* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) según el protocolo estandarizado por Tenover (Tenover *et al.*, 1995). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con dos condiciones de electroforesis (6 V/cm por 19 h a 14 ° C,

pulso inicial de 2.16 s y pulso final de 30 s y con un ángulo de 120°, una vez finalizada la electroforesis el gel fue teñido con bromuro de etidio, los patrones de bandeo del ADN fueron visualizados bajo luz UV (**Figura 8**) y el análisis del perfil de bandeo se realizó con el software Gel Comprar II (Applied Maths, Belgium). La comparación entre los patrones de bandeo fueron analizados usando los algoritmos disponibles dentro del programa. Los pulsotipos fueron definidos usando un valor de corte del 85% de homología según lo describe Foley (Foley *et al.*, 2006). Este análisis se desarrolló en CISEI, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México.

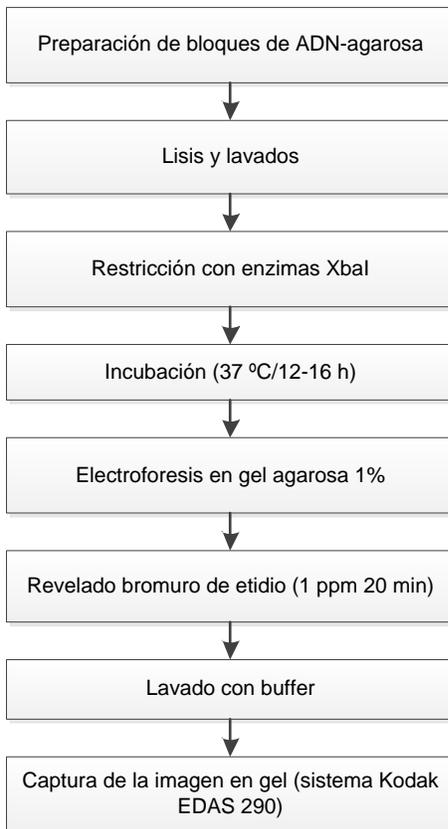


Figura 8. Técnica de electroforesis de campos pulsados

Perfil de resistencia a agentes antimicrobianos.

Para la evaluación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos, los aislamientos de *Salmonella* obtenidos durante los muestreos fueron inoculados en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) e incubados a 37°C/24h; posteriormente fueron sometidos al

método de difusión en disco en agar Muller-Hinton (Bioxon, México) según los protocolos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLS, 2015). se probaron trece antibióticos: cefotaxima, 30µg (CTX); ceftazidima 30µg (CAZ), cefalotina 30 µg (CEF), gentamicina, 10µg (GEN); imipenem, 10µg (IPM); ácido nalidíxico, 30µg (NAL); tetraciclina, 30µg (TET); ampicilina, 10µg (AMP); cloranfenicol, 30µg (CHL); ciprofloxacino, 5µg (CIP); kanamicina, 30µg (KAN) estreptomina, 10µg (S) y sulfametoxazol/trimetropin, 2.75/1.5 µg TMS (**Figura 9**).

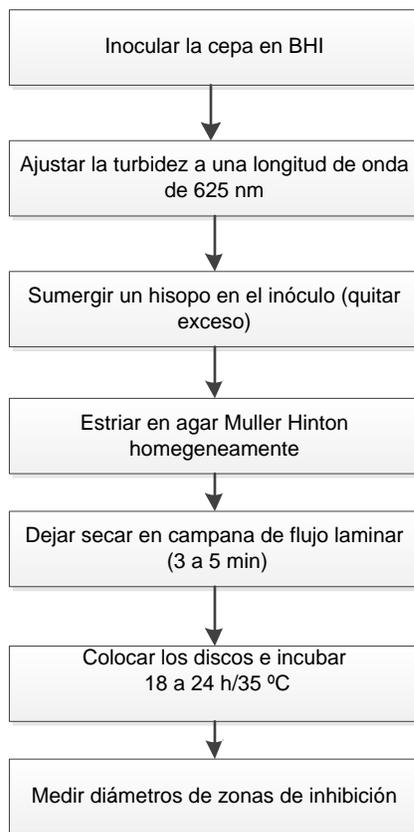


Figura 9. Esquema para evaluar la resistencia a antibióticos

Para el análisis fueron considerados los parámetros de concentración mínima inhibitoria (MIC) o los valores de la zona del diámetro de inhibición. Por ejemplo para el agente antimicrobiano “X”, el punto de interrupción de la categoría de susceptibilidad es de 4 µg/mL o 20mm, mientras que el punto de interrupción en la categoría de resistentes es de 32 µg (

Cuadro 6).

Cuadro 6. Criterios interpretativos de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Agente antimicrobiano	Concentración disco	Halo de inhibición (mm)		MIC Criterio interpretativo (µg/mL)	
		S	R	S	R
X	30 µg	≥ 20	≤ 14	≤ 4	≥ 32
Y	10 µg	≥ 16	—	≤ 1	

Fuente: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015

V.2.8 Determinación de la diversidad genética de *S. enterica* que circulan en la industria avícola.

Se estableció una plataforma bioinformática con el objetivo de identificar y caracterizar marcadores genéticos que permitan reconocer el repertorio de las serovariedades de *S. enterica*. Se analizaron 548 secuencias del gen *atpD* obtenidas del GenBank-NCBI fueron alineadas usando el programa MUSCLE (Edgar, 2004b). Los alineamientos fueron inspeccionados, corregidos y editados manualmente para comparar fragmentos del mismo número de nucleótidos (740 bases). Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas de las cepas de *Salmonella* fueron comparadas contra la base de datos del gen *atpD* construido a partir de genomas completos de *Salmonella* (n = 548) obtenidos del GenBank. En

resumen, se utilizó el software BLASTN 2.7.0 +software (Zhang *et al.*, 2000) con el objetivo de obtener las secuencias del gen *atpD* de la base de datos del NCBI Chromosome Sequences (Benson *et al.*, 2013). Los genomas con serotipos anotados y sus secuencias fueron recuperados. Las secuencias de las cepas de *Salmonella* fueron comparadas y agrupadas con un porcentaje de similitud del 100% (Edgar, 2004a). Se realizó un análisis de modelos evolutivos para determinar que el modelo Kimura 2-parameter es el método más apropiado para el análisis filogenético de este gen. Las secuencias editadas se utilizaron para análisis filogenéticos usando el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011). El Árbol filogenético fue construido usando el método de Neighbor-Joining y un análisis estadístico de bootstrap con 1,000 réplicas (Tamura *et al.*, 2004). Finalmente, las secuencias obtenidas, fueron depositadas en el GenBank bajo los siguientes números de acceso MF953958- MF953983.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Validación de iniciadores de la PCR para la identificación de *S. enterica*

La evaluación de la especificidad de 2 pares de iniciadores para el gen *16S rRNA* (16SF1 + 16SIII y MinF + MinR), 2 pares para el gen *invA* (*invA139* + *invA141* y *invAF*+ *invAR*) y 1 par para el gen *ttr* (*ttr-6F* y *ttr-4R*) se realizó mediante pruebas de gradientes de temperatura y usando material genético extraído de 8 cepas de *Salmonella*, 2 cepas de *Citrobacter* spp.

Los iniciadores 16 SF1 + 16 SIII (Lin y Tsen, 1996) amplificaron el material genético de las 8 cepas de *Salmonella*, sin amplificación del ADN extraído de las cepas de *Citrobacter*. Sin embargo, a pesar de implementar diferentes protocolos de PCR, en todos los casos se observaron amplicones inespecíficos de aproximadamente de 270 pb (**Figura 10 A**). Este problema ya ha sido documentado en otros estudios (Trkov y Avguštin, 2003). En contraste, la amplificación del gen *16S rRNA* utilizando los iniciadores MinF +MinR (Søborg *et al.*, 2013) generó amplicones específicos de

402 pb y amplificó sólo ADN obtenido de las cepas de *Salmonella* (controles positivos) **(Figura 10 B)**.

Para la amplificación del gen *invA*, los iniciadores reportados por Marlony (*invA139* + *invA141*) produjeron productos inespecíficos, a pesar de usar diferentes protocolos de PCR. Este par de iniciadores amplificaron el material genético de las 2 cepas de *Citrobacter* **(Figura 10 C)**. En contraste, los iniciadores reportados por Liu en 2002, mostraron una mayor especificidad. Este par de iniciadores amplificó exclusivamente el material genético extraído de las cepas de *Salmonella* **(Figura 10 D)**. Tanto el set de iniciadores (*MinF* + *MinR*) que amplifica el gen *16SrRNA* específico para *Salmonella* publicados por Soborg en 2013 y el set de iniciadores que amplifica el gen *invA* (*invAF*+ *invAR*) publicados por Liu en 2012. Mostraron una mayor especificidad en la amplificación de cepas de *Salmonella*, sin la generación de amplicones inespecíficos. Además es importante señalar que en el trabajo de ambos autores la especificidad de los iniciadores fue probada en muestras ambientales con presencia de inhibidores importantes de la PCR.

Finalmente los iniciadores para el gen *ttr* (Malorny *et al.*, 2004b) que codifica para la tetrionato-reductasa, mostraron una amplificación inespecífica. Estos iniciadores generaron amplicones usando ADN extraído de cepas de *Salmonella* y no-*Salmonella* **(Figura 10 E)**. Estos falsos positivos se obtuvieron a pesar de cambiar las condiciones de la PCR. En conclusión, los pares de iniciadores *MinF* + *MinR* y *invAF* + *invAR* mostraron una mayor especificidad comparada con el resto de los iniciadores evaluados. A nivel mundial en diversos laboratorios de diagnóstico existe la necesidad de armonizar, validar y estandarizar metodologías de PCR para la rápida de detección de patógenos en matrices alimentarias (Malorny *et al.*, 2004a) Basado en estos resultados, la confirmación de los aislamientos de *Salmonella* se llevó a cabo con dichos iniciadores.

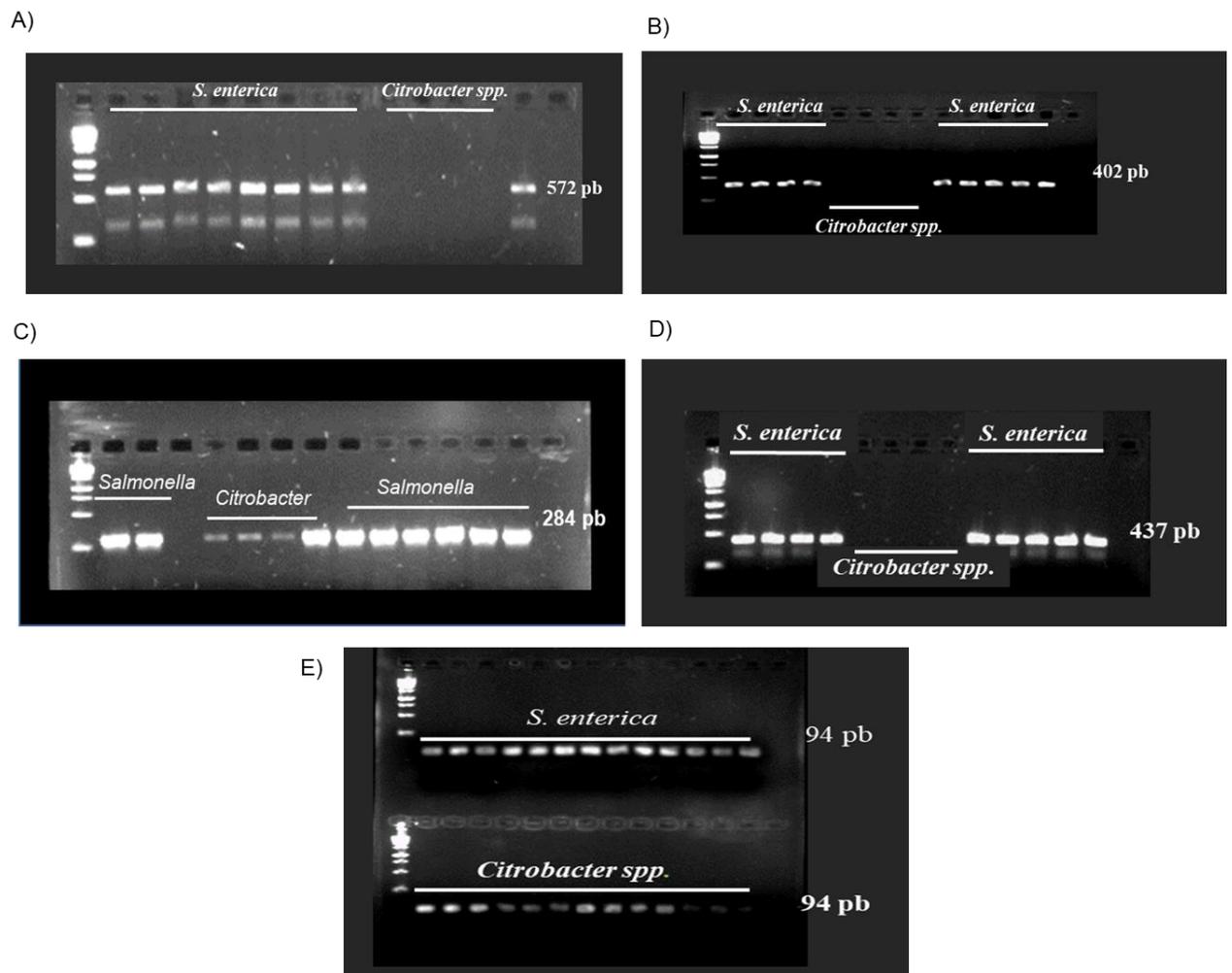


Figura 10. Validación de indicadores de PCR para la confirmación de *S. enterica*. Se utilizó el material genético de ocho cepas de *Salmonella* como controles positivos y cuatro cepas de no-*Salmonella* (*Citrobacter*) como controles negativos. Los pares de iniciadores: A) amplificación (572 pb) con 16S F1 + 16 SIII en 8/8 cepas de *Salmonella* y 0/4 (*Citrobacter*). Sin embargo, este par de iniciadores generó productos inespecíficos con un tamaño aproximado de 270 pb. B) amplificación (402 pb) con MinF + MinR en 8/8 cepas de *Salmonella* con y 0/4 no-*Salmonella*. C) amplificación (284 pb) con invA139 + invA141 en 8/8 cepas de *Salmonella* y 4/4 *Citrobacter* sp. D) amplificación (437 pb) con invA F + invA R en 8/8 cepas de *Salmonella* y 0/4 no-*Salmonella*. E) amplificación (94 pb) con ttr-6F y ttr-4R en cepas de *Salmonella* y *Citrobacter* spp.

VI.2 Sistema de clasificación *atpD*.

Los análisis filogenéticos del gen *atpD* permitieron identificar de manera precisa los serotipos de *S. enterica*. Específicamente, el análisis filogenético de 548 secuencias del gen *atpD* permitió agrupar la mayoría de los serotipos de *S. enterica* en grupos específicos permitiendo la identificación de 33 grupos que incluyen los 26 serotipos de *S. enterica* usadas en este análisis. Las secuencias fueron identificadas como ST (secuencia tipo). La mayoría de los mismos serotipos tuvieron secuencias de nucleótidos similares (98.4-100%) y fueron agrupados en el mismo grupo en el árbol filogenético. Por ejemplo, los serotipos Typhimurium, Thompson, Infantis, Agona y Derby fueron agrupados en grupos específicos; mientras que los serotipos Enteritidis-Dublin, Bredeney- Schwarzengrund fueron concentrados en el mismo grupo (Figura 11). Estos datos sugieren que el análisis filogenético del gen *atpD* permite no sólo la identificación de especies del género *Salmonella*, la rápida y precisa identificación del serotipo; sino además, establecer la posible fuente de contaminación.

En general, esta herramienta molecular permite conocer la diversidad genética de *S. enterica* mediante la comparación y análisis de identidad de secuencias de nucleótidos, además es cuantificable por el uso de los porcentajes de identidad entre las secuencias. Es de fácil acceso debido a que las secuencias de los aislamientos de *S. enterica* son subidas a la base de datos del GenBank y además permite realizar asociaciones genotipo-reservorio, lo que nos permite establecer la posible fuente de contaminación. A nivel mundial, diferentes grupos de trabajo han realizado estudios para reemplazar la serotipificación convencional debido a la complejidad que representan el uso de esta herramienta incluso entre laboratorios de referencia nacionales (Hendriksen *et al.*, 2009a; Achtman *et al.*, 2012; Seong *et al.*, 2012). El uso de marcadores genéticos como el gen *atpD* permite clasificar y distinguir entre serotipos de *Salmonella enterica*, estas observaciones son corroboradas con el trabajo realizado por Seong en el 2012, sus resultados

revelaron que el análisis de la secuencias del gen *rpoβ* de 76 cepas de *Salmonella* y 33 serotipos del patógenos pudieron clasificarse y distinguirse (Seong *et al.*, 2012). Herramientas como la serotipificación molecular puede ser más sencilla, mas costeaable, y con un menor consumo de tiempo para su ejecución comparada con la convencional.

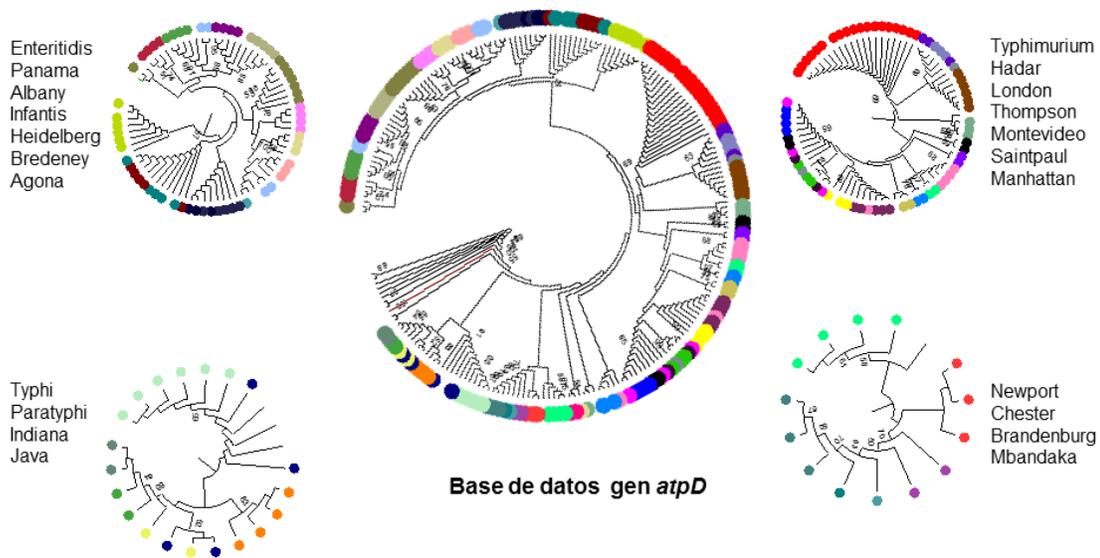


Figura 11. Análisis filogenético del gen *atpD* (sector F1 de la ATP sintetasa asociada a membrana, subunidad beta). Árbol filogenético inferido por el método de Neighbor-Joining y análisis estadístico de bootstrap con 1,000 réplicas. El número de cada brazo del árbol corresponde al valor del bootstrap para cada linaje. Para este análisis de usaron 548 secuencias de alta calidad obtenidas del GenBank. Se realizó un análisis de modelos evolutivos para determinar que el Kimura 2-parameter es el método más apropiado para este gen.

VI.3 Prevalencia y diversidad de *S. enterica* en granjas avícolas.

Se realizaron muestreos en tres granjas (A, B y C) en los meses de abril, mayo y octubre del 2016. En general, la prevalencia fue 30% (36/122). De este total, el mayor número de muestras positivas se obtuvieron de la granja C con una prevalencia del 60% (31/52), seguido de la granja B, 12% (4/34) y la granja A, 3% (1/36) (**Cuadro 7**). Prevalencias más bajas han sido reportadas por otros países como Reino Unido (11.7%), Francia (17.9%), Japón (23.6%) y Bangladesh (18%) (Snow *et al.*, 2007; Huneau-Salaun *et al.*, 2009; Iwabuchi *et al.*, 2010; Barua *et al.*, 2012). En contraste en un estudio realizado en Corea el 59.3% (19/32) de las granjas muestreadas fueron positivas a *Salmonella*. Los niveles de prevalencia reportados en el presente estudio revelan una heterogeneidad en la calidad microbiológica de las unidades de producción. Esto puede estar asociado al establecimiento de diferentes programas de control y prevención; incluyendo el uso de antibióticos, vacunas, probióticos y altos estándares de calidad en las reproductoras pesadas. Sin embargo, no existe información disponible, ya que no existe un programa oficial de control para *Salmonella* en pollo de engorda.

Cuadro 7. Prevalencia de *S. enterica* en granjas avícolas

Granja	Mes de muestreo	Núm. muestras positivas/total muestras (%)
A	Abril	1/36 (3)
B	Mayo	4/34 (12)
C	Octubre	31/52 (60)
Total		36/122 (30)

Por otra parte, se obtuvieron 41 aislamientos los cuales fueron subtipificados molecularmente a través del análisis filogenético del gen *atpD* para conocer su diversidad. El análisis reveló la presencia de 9 serotipos linajes en total. El serotipo

Typhimurium fue el más prevalente (36.6%, 15/41), seguido de Montevideo (26.8%, 11/41), Muenster (12.2%, 5/41), Anatum-Saintpaul (7.3%, 3/41), Tennessee-Agona (4.9%, 2/41), Hillingdon (4.9%, 2/41), Enteritidis (2.4%, 1/41), Infantis (2.4%, 1/41), Panama-Koessen (2.4%, 1/41). Diferente diversidad es reportada en EE.UU., donde el serotipo más prevalente es Kentucky (60.8%), seguido de Enteritidis (13.6%) y Typhimurium (7.7%) (**Figura 12**). A pesar de que en países como EE.UU. donde el serotipo más prevalente fue Kentucky, existe una similitud con la diversidad reportada en este estudio. Los datos sugieren que existen algunas fuentes de contaminación en común. Por ejemplo, fauna como insectos, pájaros, roedores son en conjunto una compleja red de factores que pueden influenciar en la diversidad genética del patógeno. Por lo que sistemas de control del patógeno son más difíciles de ejecutar en este punto de la cadena de producción. Desafortunadamente, los cuadros de salmonelosis en humanos constantemente han sido relacionados al consumo de productos avícolas, por lo que estudios constantes de monitoreo del patógeno en granjas avícolas son necesarios para minimizar la contaminación de *Salmonella* en estos productos.

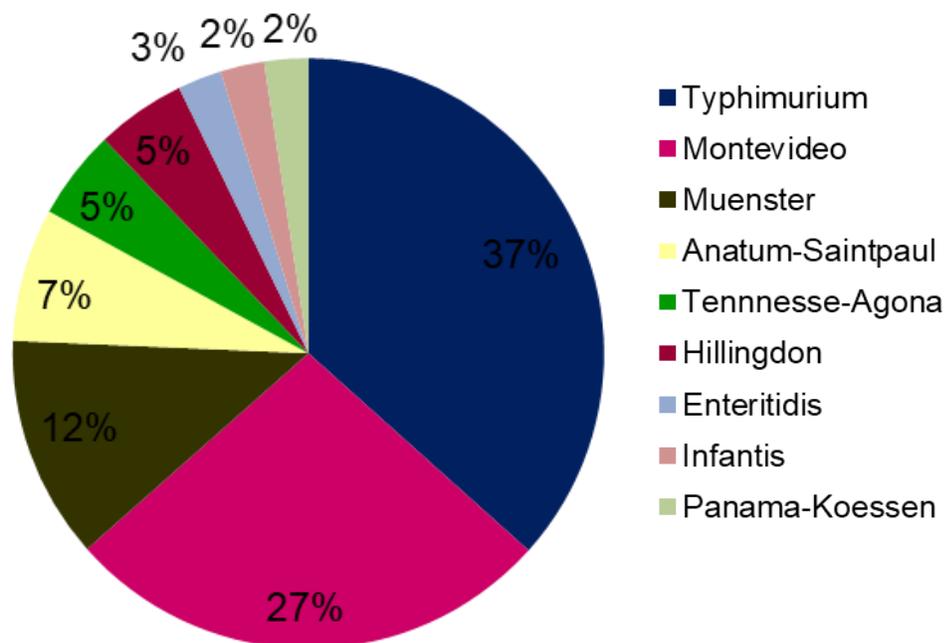


Figura 12. Prevalencia y diversidad de *S. enterica* en granjas avícolas.

VI.4 Prevalencia y diversidad de *S. enterica* en plantas de procesamiento

Se analizaron 332 muestras en total procedentes de una planta de procesamiento en 6 muestreos realizados durante el mes de Agosto 2016. En total se analizaron 47 canales y 180 piezas de cada uno de los siguientes cortes: pierna, ala, pechuga, molleja y cuello. El análisis reveló que el 32.5% (108/332) de las muestras fueron positivas a *Salmonella*. De este total el mayor porcentaje de muestras positivas fueron las de cuello con un 47% (17/36), seguido de las muestras de pierna 41.6% (15/36), pechuga 33.3% (12/36), canal en post-*chiller* 28.4% (20/74), canal en pre-*chiller* 28.2% (27/78) y ala 22.2% (8/36) respectivamente (**Cuadro 8**). El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre las piezas de pollo analizadas ($P = 0.068$). Comparables niveles de contaminación de *S. enterica* se han reportado en otras partes del mundo (Bokanyi *et al.*, 1990; Uyttendaele *et al.*, 1999; Fuzihara *et al.*, 2000; Foley *et al.*, 2006). Una de las posibles explicaciones de las altas prevalencias de *Salmonella* en plantas de procesamiento es un remoción inadecuada del tracto gastrointestinal o la contaminación de la canal con contenido intestinal (Olsen *et al.*, 2003). Además, la contaminación cruzada en el producto puede deberse a un mal manejo en etapas posteriores como son el enfriamiento y descontaminación (*chiller*), manipulación, distribución del producto (Heyndrickx *et al.*, 2002). La prevalencia de *Salmonella* en cortes fue también elevada. Este problema es común en plantas de procesamiento y se atribuye a contaminaciones cruzadas en el *chiller* u otros equipos (Uyttendaele *et al.*, 1998).

Cuadro 8. Prevalencia de *S. enterica* en piezas de pollo en plantas de procesamiento.

Piezas	Núm positivas/Núm total de muestras (%)
Pierna	15/36 (41.6)^a
Ala	8/36 (22.2)^a
Pechuga	12/36 (33.3)^a
Molleja	9/36 (25.0)^a
Cuello	17/36 (47.2)^a
Canal Pre-chiller	27/78 (28.2)^a
Canal Post-chiller	20/74 (28.4)^a
Total	108/332 (32.5)

^aLetras iguales sin diferencias significativas (Prueba de Tukey, $P>0.05$)

Los aislamientos obtenidos de diferentes cortes (pierna, ala, pechuga, molleja y cuello) fueron subtipificados molecularmente a través del análisis filogenético del gen *atpD*. El análisis reveló la presencia de 7 serotipos. El serotipo más prevalente fue Enteritidis 77.4% (24/31), Choleraesuis 6.5% (2/31), Typhimurium 3.2% (1/31), Infantis 3.2% (1/31), Tennessee-Agona 3.2% (1/31), Anatum-Saintpaul 3.2% (1/31), Rubislaw-Abaetetuba 3.2% (1/31) (**Figura 13**). Por otra parte la UE el serotipo más prevalente fue Enteritidis 35%, seguido de Infantis 38% y Kentucky 2.7% (EFSA, 2015). A pesar de que Enteritidis fue también el serotipo más prevalente, la diversidad reportada en estos países varía considerablemente comparada con la reportada en este estudio. Los datos sugieren una posible contaminación cruzada, en el área de corte, procedente de diversas fuentes como la manipulación del producto por el trabajador o utensilios que estos mismos ocupan (Rasschaert *et al.*, 2007).

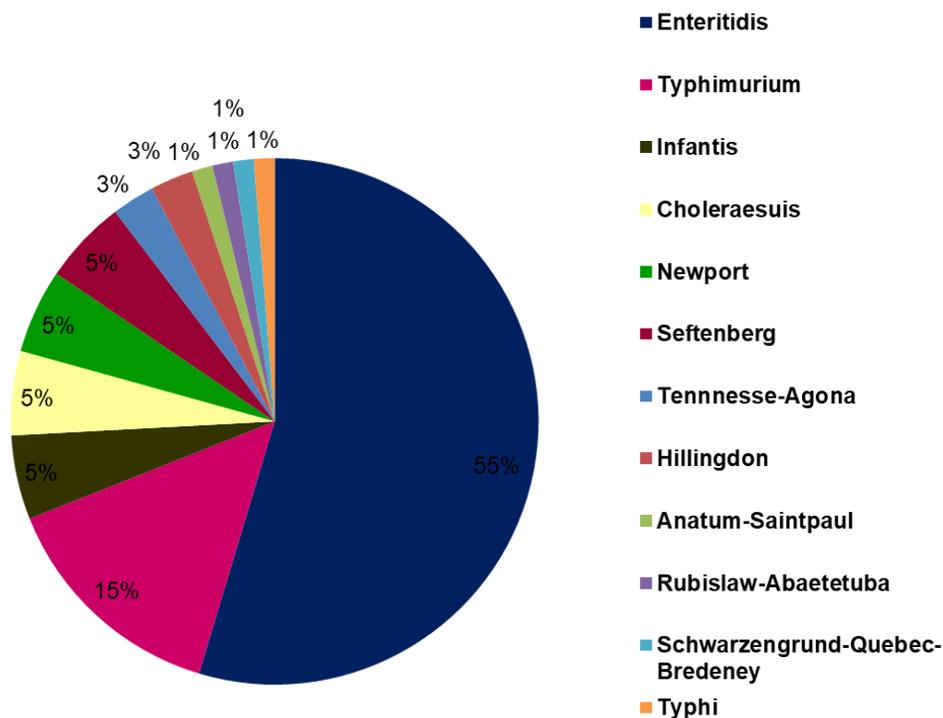


Figura 13. Prevalencia y diversidad de *S. enterica* en piezas en plantas de procesamiento.

Además, se analizó la diversidad antes (*pre-chiller*) y después (*post-chiller*) del tanque de enfriamiento (*chiller*) el cual es un punto crítico durante el procesamiento de la carne de pollo (Yang *et al.*, 2001). Los aislamientos obtenidos fueron subtipificados molecularmente a través del análisis filogenético del gen *atpD*. El análisis reveló la presencia de 9 serotipos en total. En particular, en *pre-chiller* se detectaron 8 serotipos diferentes, el más prevalente fue Typhimurium (36, 9/25), seguido de Enteritidis (20%, 5/25), Newport (12%, 3/25), Senftenberg (12%, 3/25), Infantis (8%, 2/25), Choleraesuis (4%, 1/25), Tennessee-Agona (4%, 1/25) y Schwarzengrund-Quebec-Bredeney (4%, 1/25). En *post-chiller* se detectaron 7 serotipos, el más prevalente fue Enteritidis (68.4%, 13/19), seguido de Typhimurium (5.3%, 1/19), Newport (5.3%, 1/19), Senftenberg (5.3%, 1/19), Infantis (5.3%, 1/19) y Typhi (5.3%, 1/19) (**Figura 14**). Estos resultados demuestran un cambio en la distribución de serotipos de *S. enterica* durante el proceso de enfriado de la canal de pollo. Específicamente, se demuestra una disminución en la prevalencia de

Typhimurium y un aumento en Enteritidis. Otros estudios también han demostrado que *Salmonella* Enteritidis es uno de los serotipos más prevalentes en la planta de procesamiento (Mikolajczyk y Radkowski, 2002). En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de analizar los factores biológicos que favorecen la resistencia, persistencia o proliferación del serotipo Enteritidis durante el procesamiento de la carne de pollo. Diferentes estudios señalan que *Salmonella* posee ciertos determinantes genéticos que le permiten adaptarse a ambientes fuera del huésped y que además sugieren una respuesta de sobrevivencia en ambientes difíciles como pH cambiante, disponibilidad de nutrientes, cambios de temperaturas entre otros (Ravel *et al.*, 1995; Winfield y Groisman, 2003). Por ejemplo la inactivación del gen *rpoS*, el cual expresa una proteína reguladora en situaciones de estrés, sugiere que *Salmonella* puede emplear mecanismos genéticos adicionales que le permiten sobrevivir en ambientes de estrés (Munro *et al.*, 1995). Por lo que la selección de poblaciones después del tanque de enfriamiento y el aumento de la distribución de un serotipo en específico, sugiere poblaciones con atributos que le permiten sobrevivir incluso después de la desinfección y enfriamiento.

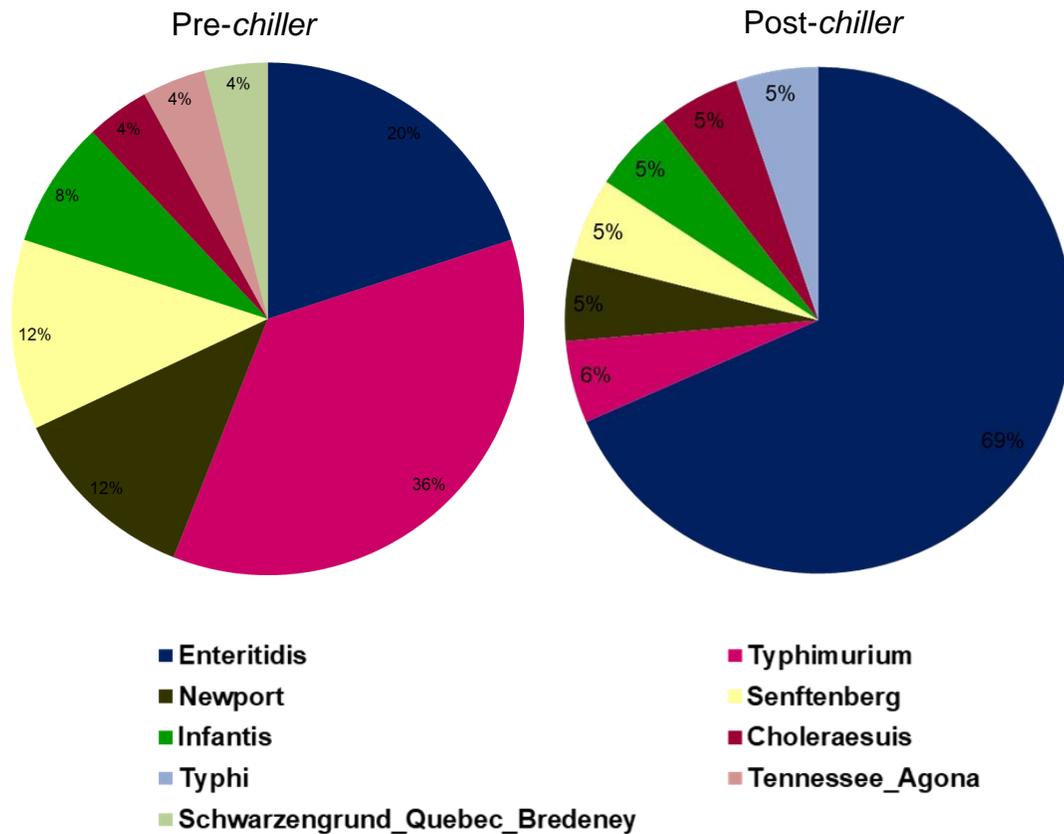


Figura 14. Prevalencia y diversidad de *S. enterica* en pre- y post-chiller.

VI.5 Prevalencia, diversidad y perfiles de resistencia de *S. enterica* en puntos de venta.

Se analizaron un total de 1,254 cuellos de pollos expendidos en supermercados y mercados públicos en seis estados productores de carne de pollo de la República Mexicana (Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Querétaro y Veracruz). El análisis reveló que el 6.2% (26/418) de las muestras fueron positivas a *S. enterica*, de este total el 3.6% (9/247) correspondieron a mercados públicos y el 9.9% (17/171) a supermercados (**Cuadro 9**). El estado que presentó el mayor porcentaje de muestras positivas en mercados públicos fue Veracruz con un 15.8% (6/38), mientras que en supermercados el estado que presentó el mayor porcentaje de

muestras positivas fue Jalisco con un 29.6 % (8/27). Se ha sugerido que las diferencias en prevalencias entre diferentes regiones geográficas se puede atribuir a la calidad microbiológica del producto y/o a las condiciones ambientales prevalentes en cada región (Waldroup, 1996; Uyttendaele *et al.*, 1998; Capita *et al.*, 2003). Sin embargo, se requieren más estudios para explicar este fenómeno.

Es importante señalar que la metodología microbiológica que se siguió en el presente estudio es homóloga a los métodos utilizados en los países de la Unión Europea. Por lo tanto, las prevalencias y perfiles de resistencia obtenidos en el presente trabajo pueden ser comparados con los resultados del Programa de Vigilancia del European Centre for Disease Prevention and Control de la EFSA, en el que participan 23 países de la Unión Europea (EFSA, 2015). Esto nos servirá como marco de referencia para comparar la situación microbiológica del país y adaptar medidas exitosas de prevención y control del patógeno.

La frecuencia de *S. enterica* en puntos de venta de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Querétaro y Veracruz es comparable con niveles reportados en varias regiones de Europa. Por ejemplo, la prevalencia de *S. enterica* en Luxemburgo (6.7%), Austria (11%), Alemania (4%) y España (3.7%) (**Cuadro 10**) (EFSA, 2015). También el número de muestras positivas en México está dentro de los límites (15.4% para piezas de pollo) establecidos por el *Food Safety and Inspection Service* (FSIS), USDA. Estos resultados indican que los niveles observados (6.2%) de *S. enterica* en puntos de venta en México, están dentro de los patrones observados en países bajo estrictas regulaciones y vigilancia epidemiológica. También estos resultados indican que se requieren hacer esfuerzos adicionales para mejorar la inocuidad de la carne de pollo expedida en mercados públicos y supermercados.

Cuadro 9. Prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo en puntos de venta.

Estado	Mercado público			Supermercado	
	Total	Positivas/total	% positivas	Positivas/total	% positivas
Veracruz	67	6/38	15.8	2/29	6.9
Jalisco	69	3/42	7.1	8/27	29.6
Querétaro	81	0/46	0	4/35	11.4
Guanajuato	68	0/38	0	3/30	10
Puebla	68	0/33	0	0/35	0
Aguascalientes	65	0/55	0	0/15	0
Total	418	Promedio	3.6	Promedio	9.9

Cuadro 10. Prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo en puntos de venta en la Unión Europea. Fuente: EFSA, 2013.

País	Muestras	Positivos (%)
Hungría	325	32.6
Eslovenia	54	16.7
Austria	127	11.0
Rumania	94	9.6
Luxemburgo	30	6.7
México*	418	6.2
Alemania	496	4.0
España	82	3.7
Países Bajos	600	3.2
Bélgica	600	3.2
Bulgaria	73	2.7
Latvia	150	2.7
Portugal, República Checa, Eslovaquia	<50	0.0

*Datos obtenidos en el presente estudio.

El análisis de prevalencia de *S. enterica* por punto de venta reveló una mayor frecuencia de este patógeno en supermercado [9.9% (17/171)] comparado con mercados públicos [3.6% 9/247)]. Estos resultados fueron corroborados por nuestro grupo de trabajo a través de un estudio temporal (11 meses) donde se analizaron muestras en supermercado (n = 672) y mercado público (n = 336). Este trabajo reveló una prevalencia de *S. enterica* en supermercado del 21.27% (143/672), porcentaje tres veces mayor (P < 0.05) a lo observado en mercado público [7.14 %, (24/336)] (Alcaraz, *et al.*, 2016). En conjunto, estos resultados revelan una mayor prevalencia de *S. enterica* en supermercados. Estos patrones de distribución son similares a lo reportado por Capita y colaboradores en el 2003. Estos autores observaron una prevalencia del patógeno en supermercados del 75% (18/24) mientras que en mercados públicos fue del 25% (4/16) (Capita *et al.*, 2003). Esto resultados pueden deberse a que el producto permanece mayor tiempo en supermercados permitiendo la proliferación de *S. enterica*; mientras que en mercados públicos, la vida de anaquel es corta (< 6 horas) (Capita *et al.*, 2003).

Los aislamientos obtenidos de carne de pollo expedida en puntos de venta de cada estado, fueron tipificados molecularmente a través del análisis filogenético del gen *atpD* (**Cuadro 11**) Los resultados revelaron la presencia de 6 serotipos en carne de pollo en puntos de venta (**Figura 15**). Los serotipos de *S. enterica* Anatum-Saintpaul fue el más prevalente (12/26, 46.2%) seguido de linaje Typhimurium (7/26, 26.9%), Minnesota (3/26, 11.5%), Enteritidis (2/26, 7.7%), Choleraesuis (1/26, 3.8%) y Abaetetuba-Rubislaw (1/26, 3.8%). El análisis reveló que los serotipos más prevalentes Anatum-Saintpaul y Typhimurium estuvieron circulando en cuatro y tres estados respectivamente; sin embargo Choleraesuis y Abaetetuba-Rubislaw estuvieron presentes en un solo estado (**Cuadro 12**). En contraste la Unión Europea reporta en 2015 diferente diversidad de serotipos; donde el serotipo Enteritidis (37.6%) e Infantis (37.4%) fueron los serotipos más prevalentes (EFSA, 2015). Por otra parte, en 2014 EE.UU., Typhimurium (26.6%), Kentucky (24.5%) y Enteritidis (18.9%) fueron los más prevalentes (NARMS, 2014). Estos resultados

sugieren la ocurrencia de un diferente repertorio de serotipos de *S. enterica* prevalentes en carne de pollo expedida en México.

Cuadro 11. Base de datos parcial del gen *atpD* depositado en el GenBank.

Estado	Punto de venta	Serotipo	Número de acceso
Querétaro	supermercado público	Anat-Saint*	MF953976
Querétaro	supermercado público	Anat-Saint	MF953961
Jalisco	supermercado público	Anat-Saint	MF953979
Jalisco	supermercado público	Minesota	MF953963
Jalisco	mercado público	Minesota	MF953970
Veracruz	supermercado público	Anat-Saint	MF953964
Veracruz	mercado público	Anat-Saint	MF953962
Jalisco	supermercado público	Typhimurium	MF953972
Jalisco	mercado público	Typhimurium	MF953975
Jalisco	supermercado público	Typhimurium	MF953969
Guanajuato	supermercado público	Typhimurium	MF953977
Jalisco	mercado público	Typhimurium	MF953959
Guanajuato	supermercado público	Anat-Saint	MF953960
Jalisco	supermercado público	Enteritidis	MF953982
Veracruz	mercado público	Typhimurium	MF953980
Veracruz	mercado público	Enteritidis	MF953978
Veracruz	mercado público	Typhimurium	MF953968
Veracruz	mercado público	Minesota	MF953966
Veracruz	mercado público	Anat-Saint	MF953958
Veracruz	supermercado público	Choleraesuis	MF953983
Querétaro	supermercado público	Anat-Saint	MF953974
Jalisco	supermercado público	Anat-Saint	MF953981
Querétaro	supermercado público	Anat-Saint	MF953973
Guanajuato	supermercado público	Abae-Rubis	MF953965
Jalisco	supermercado público	Anat-Saint	MF953971
Jalisco	supermercado público	Anat-Saint	MF953967

*Anat-Saint: Anatum-Saintpaul

Cuadro 12. Distribución de la diversidad genética de *S. enterica* en diferentes estados de la República Mexicana.

Número de aislamientos por Estado					
Linaje ^a	Jalisco ^b	Querétaro	Puebla	Aguascalientes	Total
Anatum-Saintpaul	1	4	4	3	12
Typhimurium	1	4	-	2	7
Minnesota	-	2	-	1	3
Enteritidis	-	1	-	1	2
Choleraesuis	-	-	-	1	1
Abaetetuba-Rubislaw	1	-	-	-	1
Total	3	11	4	8	26

^aLinajes determinados mediante la amplificación y secuenciación mediante el análisis genético del gen *atpD*, marcador molecular asociado a la serotipificación fenotípica. ^bNúmero de aislamientos recuperados de los estados de Veracruz y Guanajuato. -: No detectado.

Análisis de pulsotipos de *S. enterica* recuperada en carne de pollo en puntos de venta.

Los aislamientos de *Salmonella* fueron sometidos al análisis de PFGE. Un total de 13 pulsotipos (85% de similitud) fueron identificados; similares serotipos fueron colocados en diferentes pulso-grupos, como lo reportan otros autores (Bosilevac *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2013). En contraste, los perfiles del análisis de los campos pulsados estuvieron más relacionados al perfil de resistencia. El estado donde se encontró la mayor diversidad de pulsotipos fue en el estado de Jalisco (n = 6), seguido de Veracruz (n = 5), Querétaro (n = 3), y Guanajuato (n = 3). También, un alto número de pulsotipos fueron observados en supermercados (n

= 10) comparado con mercados públicos (n = 6) (**Figura 16**). En diferentes regiones a nivel mundial es comparable esta alta diversidad de pulsotipos en puntos de venta (White *et al.*, 2001; Bosilevac *et al.*, 2009). Estos resultados revelan el gran número de genotipos de *S. enterica* circulando en carne cruda, lo cual representa un potencial riesgo a la salud humana.

Además este análisis mostró que tres pulsotipos (PS-1,-3 Y -7) estuvieron distribuidos en mercados y supermercados en el mismo estado, lo que sugiere una fuente local de *Salmonella* en común. También se encontró que los pulsotipos (PS-2,-5,-12) estuvieron distribuidos en múltiples estados, lo que sugiere una fuente de *Salmonella* en común, potencialmente distribuida entre diferentes estados (**Figura 16**). En conjunto, los datos sugieren múltiples fuentes de contaminación de *Salmonella* en puntos de venta. Estos datos justifican la necesidad de implementar exhaustivos y frecuentes sistemas de vigilancia epidemiológica de *Salmonella* en México que sirvan para identificar y poder rastrear fuentes de contaminación.

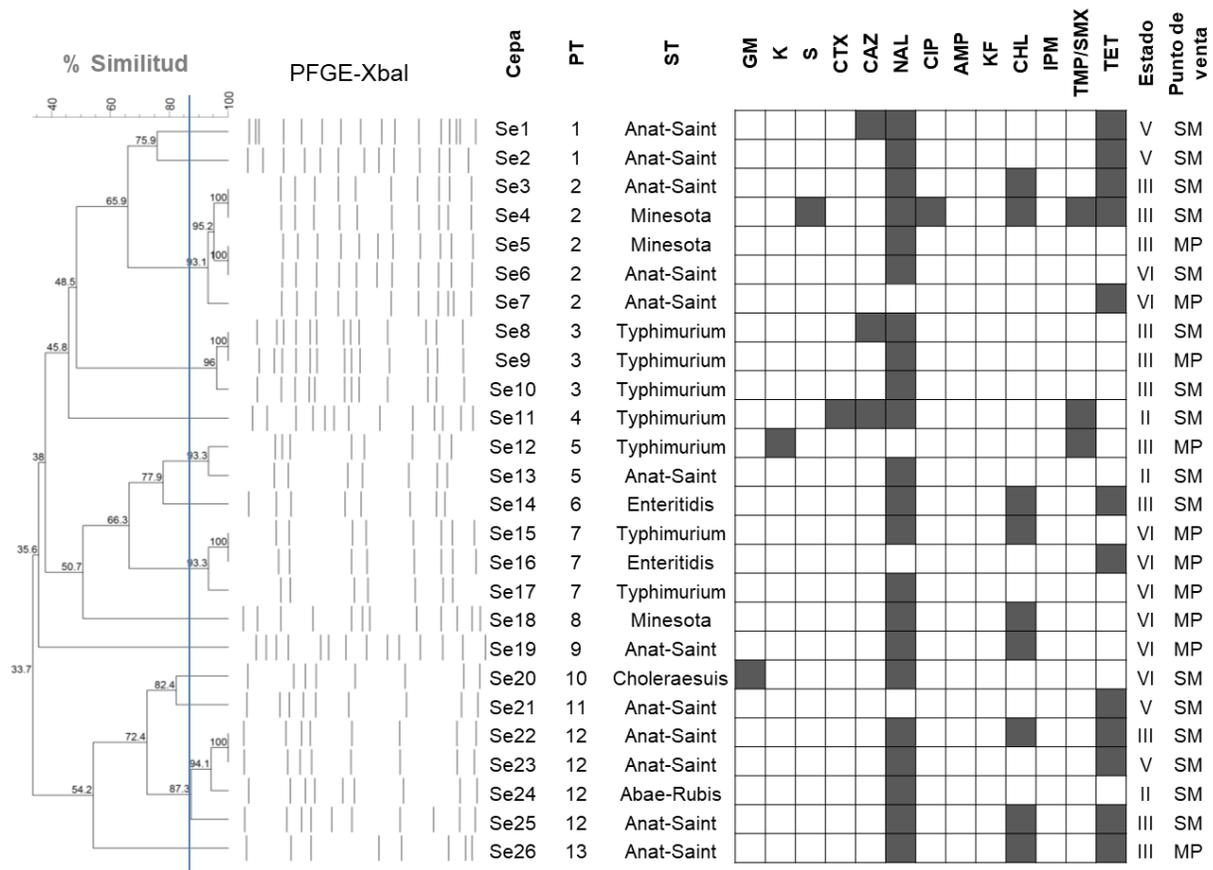


Figura 16. Dendrograma de perfiles de campos pulsados y resistencia a antibióticos de 26 aislamientos de *Salmonella* recuperados de carne de pollo en puntos de venta. Pulsotipo (PT), sequence-type (ST), Estado y fuente de aislamiento (SM: supermercado, MP: mercado público). Punto de corte, 85% punto de corte, representado por línea. Resistencia a Ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), gentamicina (GEN), tetraciclina (TET), trimetoprim/sulfametoxazol (TMS), kanamicina (KAN), ácido nalídixico (NAL), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefalotina (CF), imipenem (IPM), ciprofloxacino (CIP), estreptomicina (S).

Análisis de resistencia a antibióticos de *S. enterica* recuperada en carne de pollo en puntos de venta

El análisis de perfiles de resistencia a antibióticos reveló que una alta proporción de los aislamientos fueron resistentes a Acido nalidíxico 85% (22/26), Tetraciclina 46% (12/26) y Cloranfenicol 35% (9/26); mientras que 12% (3/26) fue resistente a Ceftazidime y Trimetoprim/sulfametoxazol respectivamente, el 4% (1/26) a Cefotaxima, Gentamicina, Ciprofloxacino, Kanamicina y Estreptomicina; finalmente el 0% (0/26) de los aislamientos no fueron resistentes a Cefalotina, Imipenem y Ampicilina (**Figura 17**). Estos perfiles difieren considerablemente de los patrones obtenidos de carne de pollo en puntos de venta de EE.UU. El NARMS-FDA reportó una mayor prevalencia, a nivel nacional, de *S. enterica* No-resistente a ácido nalidíxico 51.7% y solo un 2.8% resistente (NARMS 2015, 2013). En contraste, los perfiles de resistencia a antibióticos son más semejantes a lo observado por la EFSA en la Unión Europea. Por ejemplo, en el 2013, se encontró que el 65.8% de los aislamientos fueron resistentes a ácido nalidíxico, tetraciclina 54.0% y cloranfenicol 2.1% (EFSA, 2015). En conjunto, estos datos denotan las diferencias regionales en perfiles de resistencia. Estudios adicionales en México nos permitirán corroborar la multiresistencia de la *S. enterica* endémica del país.

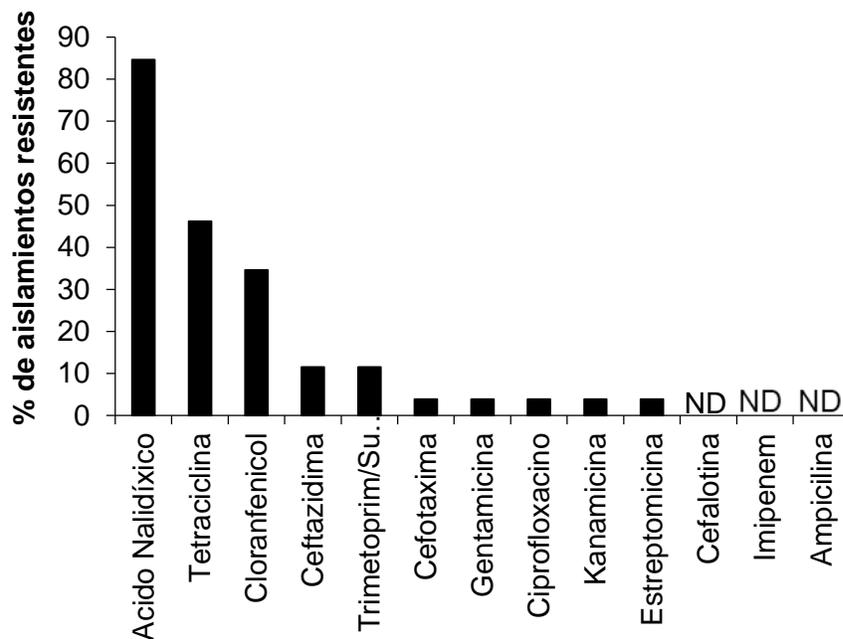


Figura 17. Frecuencia (%) de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* aisladas de carne de pollo en puntos de venta. No Detectado (ND).

El análisis de resistencia reveló que el 92.3% (24/26) de los aislamientos fueron resistentes de 1-3 antibióticos, el 7.7% (2/26) de los aislamientos fue resistente a 4-6 antibióticos y 0% fue resistente a más de 7 antibióticos (**Figura 18**). Estos resultados revelan que la resistencia a los antibióticos que presentan los aislamientos obtenidos en este estudio es menos grave que lo que reporta países como China; donde el 25%, 11% y 28% de los aislamientos obtenidos en puntos de venta fueron resistentes a 1-3, 4-6, 7-9 y más de 9 antibióticos, respectivamente (Yang *et al.*, 2010). La alta ocurrencia de aislamientos de *Salmonella* resistentes a más de 7 antibióticos pudo ser debido a la asociación de un gran consumo de antibióticos en la industria del ganado en China (Van Boeckel *et al.*, 2015). En términos de multiresistencia (aislamientos resistentes a más de 2 clases antibióticos), el presente estudio reveló que el 38.5% (10/26) de los aislamientos de *S. enterica* fue resistente a más de una clase de antibióticos, 30.8% (8/26) a 2 clases de antibióticos, 26.9% (7/26) a 3 clases de antibióticos, 3.8% (1/26) a 5 clases de antibióticos, y 0% fue resistente a más de 6 clases de antibióticos (**Figura**

18). Estos resultados indican que la ocurrencia de *Salmonella* multirresistente en carne de pollo es un potencial problema en México, un hallazgo previamente descrito en otros países (Voss-Rech *et al.*, 2015) (NARMS, 2014; EFSA, 2015).

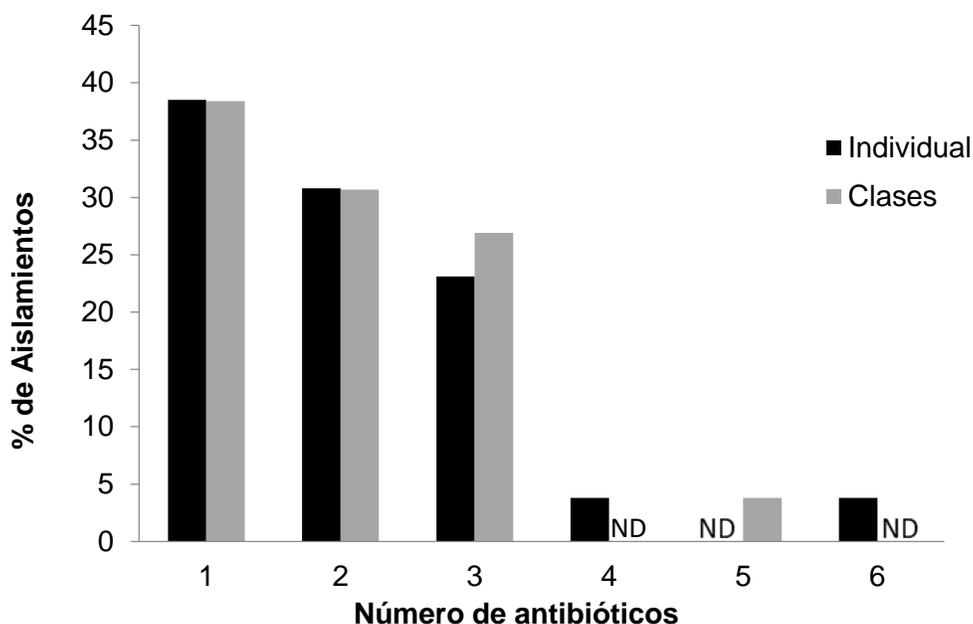


Figura 18. Frecuencia (%) de *Salmonella* multirresistente aislada de supermercados y mercados públicos. Perfiles de resistencia a antibióticos individuales o diferentes clases. No detectado (ND).

Además los aislamientos de *Salmonella* recuperados de Supermercados fueron más resistentes (en promedio 2.4 antibióticos) que los aislamientos recuperados de Mercados Públicos (promedio 1.4 antibióticos) ($P = 0.004$; **Cuadro 13**). Por lo tanto, el análisis de multirresistencia reveló que el 47.1% (8/17) de los aislamientos recuperados de los supermercados y fueron multirresistentes comparados con el 0% (0/9) de los aislamientos provenientes de mercados públicos (**Cuadro 13**). Por lo tanto, *Salmonella* multirresistente fue 17.0 veces más probable (odds ratio = 17.0, $P = 0.06$) de ser hallada en Supermercados que en Mercados Públicos (**Cuadro 13**). Estos resultados resaltan la necesidad de establecer estudios nacionales para monitorear la prevalencia de *Salmonella* y la emergencia de

nuevas cepas multirresistentes. Por ejemplo, en EE.UU., un estudio nacional realizado entre 2009 y 2014 reportó una disminución en la prevalencia de *Salmonella* multirresistente de un 48% a un 20% en carne de pollo, después establecer numerosas estrategias sanitarias (NARMS, 2014). Los sistemas de monitoreo de *Salmonella* multirresistente es esencial para preservar la salud en humanos, debido a que esta clase de patógenos generan infecciones más severas (Krueger *et al.*, 2014). La carne de pollo es una importante fuente de *Salmonella* multirresistente, por lo que son necesarios estudios para elucidar estrategias sanitarias para reducir este riesgo.

Cuadro 13. Ocurrencia de *S. enterica* multirresistente en carne de pollo en puntos de venta.

	Supermercados	Mercados Públicos	P-value
Número de antibióticos ^a	2.41 (1.32) ^b	1.44 (0.52)	0.04 ^c
Aislamientos multirresistentes	47.06% (8/17) ^e	0% (0/9)	0.06 odds ratio = 17.0 95% CI (0.85-338.27)

^aNúmero de antibióticos a los cuales los aislamientos son resistentes. ^bMedia (desviación estandar). ^cPrueba estadística: T student. ^dResistencia a más de 2 clases de antibióticos. ^ePorcentaje (número de aislamientos/total).

En general, *S. enterica* Minnesota mostró una resistencia hasta 6 antibióticos y Typhimurium hasta 4 antibióticos (**Figura 16**). La resistencia que mostró *Salmonella* Minnesota y Typhimurium es una importante amenaza a la salud a nivel mundial. Por ejemplo, en Brasil, el 60.6% de los aislamientos de *Salmonella* Minnesota recuperados de granjas de pollo fueron resistentes de 2-3 clases de antibióticos (Voss-Rech *et al.*, 2015). Sin embargo, en China, el 27% de los aislamientos de

Typhimurium obtenidos de puntos de venta han mostrado una resistencia mayor a 9 antibióticos (Krueger *et al.*, 2014)

VI.6 Prevalencia de *S. enterica* en la cadena de producción de carne de pollo

En general, la prevalencia de *S. enterica* en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta fue de 27.0%, 32.3% y 21.4%, respectivamente (**Figura 19**). Se observó una mayor prevalencia ($P < 0.05$) en plantas de procesamiento comparado con granjas y puntos de venta. Estas prevalencias sobrepasan los límites permitidos por las autoridades sanitarias de otros países (granjas 1% y en plantas de procesamiento 20% y puntos de venta 15%) (BIOHAZ, 2011; EFSA, 2015). Por ejemplo, los programas sanitarios establecidos en la Unión Europea han logrado disminuir considerablemente la prevalencia del *S. enterica* (granjas: 1.9%, plantas de procesamiento: 3.5% y puntos de venta: 3.5%) en los últimos años (EFSA, 2015). Monitoreos constantes del patógeno en estos países han permitido disminuir los niveles de contaminación. De la misma manera, en EE.UU., el USDA-FSIS ha establecido programas sanitarios para reducir los niveles de contaminación por *S. enterica* a 15.4% en plantas de procesamiento y 5% en granjas. En conjunto, estos resultados resaltan la necesidad de diseñar y establecer planes de monitoreo constantes y desarrollar planes sanitarios para la reducción del patógeno en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta de México.

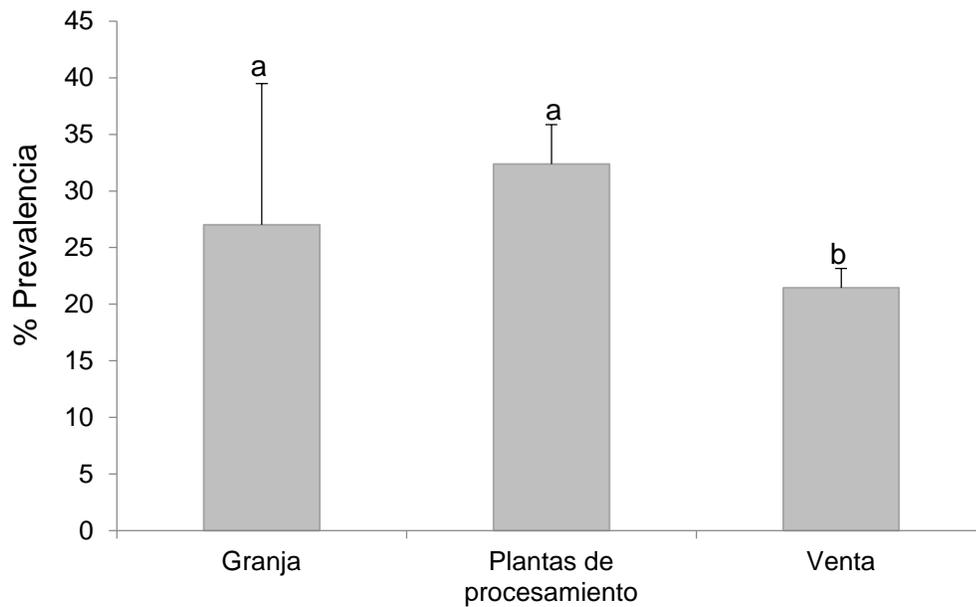


Figura 19. Prevalencia de *S. enterica* en la cadena de producción de carne de pollo. Muestras positivas/muestras totales en granja (36/122), plantas de procesamiento (108/332) y puntos de venta (193/1,426). Los datos fueron ajustados mediante la transformación a la raíz cuadrada del arco-seno. Prueba estadística de Tukey ($P < 0.05$).

VI.7 Panorama general de la diversidad genética y distribución de *S. enterica* en la cadena de producción de carne de pollo.

El análisis de la diversidad genética de *S. enterica* en granja, plantas de procesamiento y puntos de venta reveló la ocurrencia de 19 genotipos prevalentes durante la cadena de producción de carne de pollo (**Figura 20**). En general, los serotipos más prevalentes fueron Enteritidis 47.8% (121/253), seguido de Typhimurium 16.2% (41/253), Anatum-Saintpaul 8.7% (22/253), Montevideo 4.3% (11/253), Infantis 3.6% (9/253), Choleraesuis 3.6% (9/253), Tennessee-Agona 2.8% (7/253), Muenster 2.4% (6/253), Newport 2.0% (5/253), Senftenberg 2.0% (5/253) y otros 6.8% (17/253) (**Cuadro 14**).

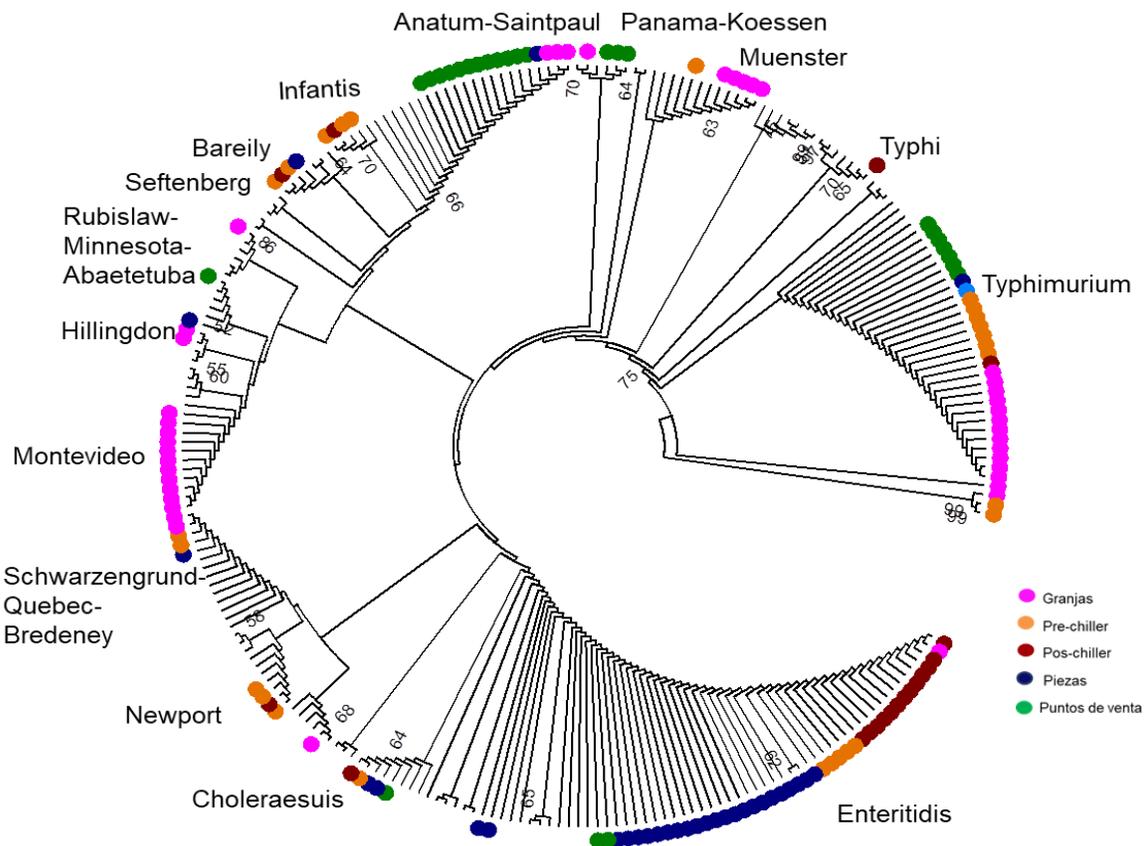


Figura 20. Subtipificación molecular de aislamientos de *S. enterica* en la cadena de producción de carne de pollo. Comparación de 256 secuencias del gen *atpD* de los 256 aislamientos de *Salmonella* contra 548 genomas completos de *Salmonella*. Árboles filogenéticos Similares fueron obtenidos utilizando los modelos Maximum Parsimony, Neighbor-Joining y Minimum Evolution. Los números en las ramas indican valores de bootstrap después de 1,000 réplicas.

Cuadro 14. Prevalencia de serotipos de *S. enterica* recuperada en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta.

Serotipo	Granjas	Plantas de procesamiento	Punto de venta	Total	%
Enteritidis	1	42	78	121	47,8
Typhimurium	15	11	15	41	16,2
Anatum_Saintpaul	3	1	18	22	8,7
Montevideo	11	0	0	11	4,3
Infantis	1	4	4	9	3,6
Choleraesuis	0	4	5	9	3,6
Tennessee_Agona	2	2	3	7	2,8
Muenster	5	0	1	6	2,4
Newport	0	4	1	5	2,0
Senftenberg	0	4	1	5	2,0
Rubislaw_Abaetetuba	0	1	2	3	1,2
Schwarzengrund_Quebec_B					
Redeney	0	1	2	3	1,2
Minnesota	0	0	3	3	1,2
Hillingdon	2	0	0	2	0,8
Panama_Koessen	1	0	1	2	0,8
Typhi	0	1	0	1	0,4
Albany	0	0	1	1	0,4
Johannesburg	0	0	1	1	0,4
Thompson	0	0	1	1	0,4
Total	41	75	137	253	100

En particular, los serotipos más prevalentes en granjas fueron: Typhimurium con un 36.6% (15/41), seguido de Montevideo con un 26.8% (11/41), Muenster 12.2% (5/41) y Anatum-Saintpaul 7.3% (3/41), Tennessee-Agona 4.9% (2/41) y Hillingdon

4.9% (2/41). Resultados similares se obtuvieron en plantas de procesamiento siendo Enteritidis 56% (42/75) y Typhimurium 14.7% (11/75) los serotipos más prevalentes. Finalmente, en puntos de venta los serotipos más prevalentes fueron Enteritidis 56.9% (78/137), Typhimurium 10.9% (15/137) y Anatum-Saintpaul 13.1% (18/137) (**Figura 21**). Esta diversidad de serotipos difiere considerablemente de lo reportado en países de la Unión Europea. Por ejemplo, en granjas los tres serotipos más prevalentes fueron Infantis (26%), Mbandaka (17.3%) y Thompson (12.6%); mientras que en plantas de procesamiento fueron Infantis (37.4%), Enteritidis (37.6%) y Kentucky (4.1%) (EFSA, 2015). En EE.UU., los serotipos más prevalentes en punto de venta fueron Typhimurium (38.4%), seguido de Kentucky (27.07%), Enteritidis (11.3%) y Heidelberg (7.4%) (NARMS, 2014). Estos resultados sugieren una diferencia considerable de serotipos de *S. enterica* endémicos en México. La persistencia de ciertos serotipos en la cadena de producción de carne de pollo ha sido estudiada por diversos grupos de trabajo (Sanchez *et al.*, 2002; Liljebjelke *et al.*, 2005) Por ejemplo, Liljebjelke y colaboradores en 2005 señalaron que los mismos serotipos Enteritidis (64%) y Typhimurium (12%) recuperados de dos granjas fueron hallados también en plantas de procesamiento, Enteritidis (10%) y Typhimurium (83%), además los aislamientos fueron caracterizados mediante el análisis de pulsotipos; los resultados revelaron patrones indistinguibles entre los aislamientos recuperados en granjas y en las plantas de procesamiento, sugiriendo un transmisión vertical de los serotipos de *Salmonella* en la cadena de producción de carne de pollo (Liljebjelke *et al.*, 2005). Además es importante resaltar, que en los sitios de expendio de carne de pollo es un punto crítico que tiene implicaciones sanitarias trascendentales; así que el diseño en los planes de monitoreo del patógeno enfocados a reducir o erradicar el patógeno de estos tres ambientes (granjas, plantas de procesamiento y puntos de ventas) son necesarios para prevenir la introducción del patógeno y su re inducción en las granjas avícolas (Mead, 2000)

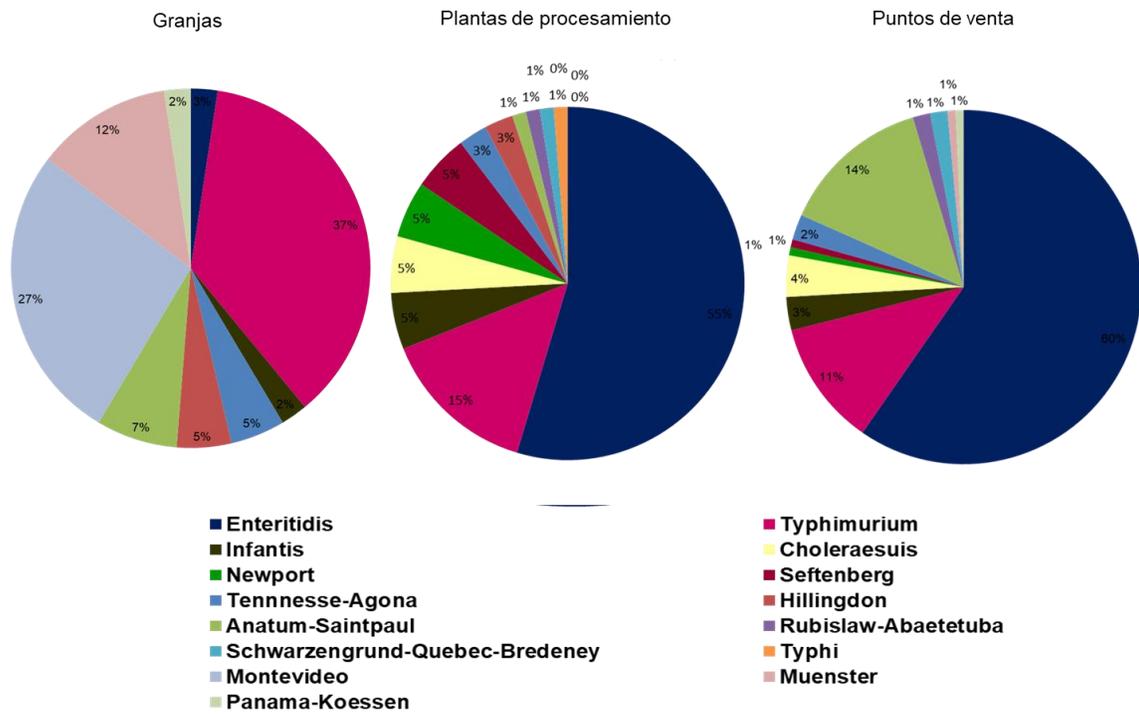


Figura 21. Diversidad y distribución de *S. enterica* en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta.

VII Conclusiones

En general, la prevalencia de *S. enterica* en granjas, plantas de procesamiento y puntos de venta fue de 27.0%, 32.3% y 21.4%, respectivamente. Estos niveles de contaminación sobrepasan los límites establecidos por autoridades sanitarias de Unión Europea y EE.UU. Esta información resalta la necesidad de establecer programas de vigilancia y control para disminuir la prevalencia de este patógeno en la cadena de producción de carne de pollo.

En puntos de venta, se observó que una alta proporción de aislamientos de *S. enterica* son resistentes a ácido nalidíxico, tetraciclina y cloranfenicol. También se observó la ocurrencia de aislamientos multirresistente a antibióticos. Interesantemente, los aislamientos de *S. enterica* obtenidos de carne de pollo expedida en supermercado fueron más resistentes a antibióticos en comparación a los aislamientos de mercado público. En conjunto, estos resultados indican que la carne de pollo puede ser una fuente importante de *S. enterica* multirresistente antibióticos y un potencial riesgo para la salud.

Además, en el presente estudio se estableció un sistema de serotipificación molecular para la rápida y efectiva caracterización de aislamientos de *S. enterica* endémicos de México. Esto permitió identificar que los serotipos más prevalentes en granjas fueron Typhimurium, Montevideo y Muenster; mientras que, en plantas de procesamiento y puntos de venta fueron Enteritidis y Typhimurium. Esta información ofrece la primera evidencia de la diversidad de serotipos que circulan en la industria productora de carne de pollo. Estos datos permitirán fundamentar medidas de prevención y control para reducir la prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Achtman, M. *et al.* 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS pathogens 8: e1002776.
- Antunes, P. c., C. Réu, J. C. Sousa, L. s. Peixe, y N. Pestana. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. International journal of food microbiology 82: 97-103.
- Arvanitidou, M., A. Tsakris, D. Sofianou, y V. Katsouyannopoulos. 1998. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. International Journal of Food Microbiology 40: 197-201.
- Ashton, P. M. *et al.* 2016. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing. PeerJ 4: e1752.
- Bailey, J. S. 1993. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A summary of work at Russell Research Center. Poultry science 72: 1169-1173.
- Baker, S., W. P. Hanage, y K. E. Holt. 2010. Navigating the future of bacterial molecular epidemiology. Current opinion in microbiology 13: 640-645.
- Barrett, E. L., y M. A. Clark. 1987. Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. Microbiological reviews 51: 192-205.
- Barua, H., P. K. Biswas, K. E. Olsen, y J. P. Christensen. 2012. Prevalence and characterization of motile *Salmonella* in commercial layer poultry farms in Bangladesh. PloS one 7: e35914.
- Bell, R. L., K. G. Jarvis, A. R. Ottesen, M. A. McFarland, y E. W. Brown. 2016. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. Microbial biotechnology 9: 279-292.
- Benson, D. A. *et al.* 2013. GenBank. Nucleic acids research 41: D36-42.
- Berghaus, R. D. *et al.* 2013. Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. Applied and environmental microbiology 79: 4106-4114.
- BIOHAZ, E. 2011. Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in broilers. EFSA J 9: 2106.
- Bokanyi, R. P., Jr., J. F. Stephens, y D. N. Foster. 1990. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. Poultry science 69: 592-598.
- Bosilevac, J. M., M. N. Guerini, N. Kalchayanand, y M. Koohmaraie. 2009. Prevalence and characterization of salmonellae in commercial ground beef in the United States. Applied and environmental microbiology 75: 1892-1900.
- Burfoot, D. *et al.* 2011. Fate of *Salmonella* spp. on broiler carcasses before and after cutting and, or deboning. Technical report, Campden BRI and University of Bristol. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/45e.pdf>, last accessed on January 17.

- Capita, R., C. Alonso-Calleja, y M. Prieto. 2007. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1366-1375.
- Capita, R., M. Álvarez-Astorga, C. Alonso-Calleja, B. Moreno, y M. a. del Camino García-Fernández. 2003. Occurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 81: 169-173.
- Cardinale, E. *et al.* 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of applied microbiology* 99: 968-977.
- Carraminana, J. J. *et al.* 1997. *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection* 60: 1312-1317.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews* 17: 840-862.
- Clotilde, L. M. *et al.* 2015. Comparison of multiplex immunochemical and molecular serotyping methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Foodborne pathogens and disease* 12: 118-121.
- Cox, N. A., J. A. Cason, y L. J. Richardson. 2011. Minimization of *Salmonella* contamination on raw poultry. *Annual review of food science and technology* 2: 75-95.
- Chen, S. *et al.* 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and environmental microbiology* 70: 1-7.
- Christensen, H., y J. E. Olsen. 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding the beta subunit of ATP synthase. *FEMS microbiology letters* 161: 89-96.
- Datta, A. R., P. Laksanalamai, y M. Solomotis. 2013. Recent developments in molecular sub-typing of *Listeria monocytogenes*. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 30: 1437-1445.
- de Oliveira, S. I. D., F. S. Flores, L. R. dos Santos, y A. Brandelli. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International journal of food microbiology* 97: 297-305.
- Doyle, M. P., y L. R. Beuchat. 2007. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press.
- Drancourt, M. *et al.* 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology* 38: 3623-3630.
- Duarte Martinez, F. *et al.* 2010. SALMATcor: microagglutination for *Salmonella* flagella serotyping. *Foodborne pathogens and disease* 7: 907-911.

- Echeita, M. A., S. Herrera, J. Garaizar, y M. A. Usera. 2002. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. *Research in microbiology* 153: 107-113.
- Edgar, R. C. 2004a. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5: 113.
- Edgar, R. C. 2004b. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5: 113.
- EFSA. 2010. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal* 8: 1437.
- EFSA. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13.
- Fendri, I. *et al.* 2013. Genetic diversity of food-isolated *Salmonella* strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR). *PloS one* 8: e81315.
- Foley, S. L. *et al.* 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *Journal of clinical microbiology* 44: 3569-3577.
- Fuzihara, T. O., S. A. Fernandes, y B. D. Franco. 2000. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *Journal of food protection* 63: 1749-1753.
- Galán, J. E., y R. Curtiss. 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and immunity* 59: 2901-2908.
- Galan, J. E., C. Ginocchio, y P. Costeas. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *Journal of bacteriology* 174: 4338-4349.
- Galanis, E. *et al.* 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerging infectious diseases* 12: 381-388.
- Grimont, P. A., y F.-X. Weill. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
- Harbottle, H., D. White, P. McDermott, R. Walker, y S. Zhao. 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *Journal of clinical microbiology* 44: 2449-2457.
- Hendriksen, R. S. *et al.* 2009a. WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *Journal of clinical microbiology* 47: 2729-2736.
- Hendriksen, R. S. *et al.* 2009b. WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *Journal of clinical microbiology* 47: 2729-2736.

- Henriksen, S. 1978. Chapter I Serotyping of Bacteria. *Methods in Microbiology* 12: 1-13.
- Hensel, M., A. P. Hinsley, T. Nikolaus, G. Sawers, y B. C. Berks. 1999. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* 32: 275-287.
- Hernández, C., M. Aguilera A, y G. Castro E. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 31: 137.
- Herrera-Leon, S. *et al.* 2007. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Research in microbiology* 158: 122-127.
- Heyndrickx, M. *et al.* 2002. Routes for salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and infection* 129: 253-265.
- Holt, K. E. *et al.* 2010. High-throughput bacterial SNP typing identifies distinct clusters of *Salmonella* Typhi causing typhoid in Nepalese children. *BMC Infectious Diseases* 10: 144.
- Hoorfar, J. 2011. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *APMIS. Supplementum*: 1-24.
- Hoorfar, J., D. L. Baggesen, y P. H. Porting. 1999. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *Journal of microbiological methods* 35: 77-84.
- Huehn, S. *et al.* 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne pathogens and disease* 7: 523-535.
- Huneau-Salaun, A. *et al.* 2009. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in 519 French laying hen flocks at the end of the laying period. *Preventive veterinary medicine* 89: 51-58.
- Iwabuchi, E. *et al.* 2010. Nationwide survey of *Salmonella* prevalence in environmental dust from layer farms in Japan. *Journal of food protection* 73: 1993-2000.
- Jacob, W. F., M. Santer, y A. E. Dahlberg. 1987. A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4757-4761.
- Janda. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology* 45: 2761-2764.
- Kaniga, K., S. Tucker, D. Trollinger, y J. E. Galan. 1995. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella* Typhimurium entry into cultured epithelial cells. *Journal of bacteriology* 177: 3965-3971.
- Kim, S. *et al.* 2006. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Journal of clinical microbiology* 44: 3608-3615.

- Kotzekidou, P. 2013. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. Food microbiology.
- Krueger, A. L. *et al.* 2014. Clinical outcomes of nalidixic acid, ceftriaxone, and multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections compared with pansusceptible infections in FoodNet sites, 2006-2008. Foodborne pathogens and disease 11: 335-341.
- Lammerding, A. *et al.* 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. Journal of Food Protection 51.
- Lassnig, H. *et al.* 2012. Prevalence of *Salmonella* spp. in Austrian broiler flocks in the context of the EU-wide baseline survey 2005-2006. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift 125: 129-137.
- Liljebjelke, K. A. *et al.* 2005. Vertical and horizontal transmission of salmonella within integrated broiler production system. Foodborne pathogens and disease 2: 90-102.
- Lin, C., y H. Tsen. 1996. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. Journal of applied bacteriology 80: 659-666.
- Liu, B. *et al.* 2014. Structural diversity in *Salmonella*O antigens and its genetic basis. FEMS microbiology reviews 38: 56-89.
- Liu, F. *et al.* 2011. Subtyping *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). Applied and environmental microbiology 77: 4520-4526.
- Liu, T. *et al.* 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. Journal of Food Protection® 65: 1227-1232.
- Lowder, B. V. *et al.* 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 19545-19550.
- MacLean, D., J. D. Jones, y D. J. Studholme. 2009. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. Nature Reviews Microbiology 7: 287-296.
- Magomani, V. *et al.* 2014. Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease. Journal of clinical microbiology 52: 3271-3276.
- Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge, y R. Helmuth. 2003a. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Applied and environmental microbiology 69: 290-296.
- Malorny, B. *et al.* 2003b. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. International journal of food microbiology 89: 241-249.
- Malorny, B. *et al.* 2004a. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. Applied and environmental microbiology 70: 7046-7052.
- Malorny, B. *et al.* 2004b. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. Applied and environmental microbiology 70: 7046-7052.

- McQuiston, J. *et al.* 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *Journal of clinical microbiology* 42: 1923-1932.
- Mead, G. 2000. Prospects for 'competitive exclusion'treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *The Veterinary Journal* 159: 111-123.
- Mellmann, A. *et al.* 2008. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases* 14: 1287.
- Mermin, J., B. Hoar, y F. J. Angulo. 1997. Iguanas and *Salmonella* marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics* 99: 399-402.
- Mikolajczyk, A., y M. Radkowski. 2002. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plants in Poland. *Journal of food protection* 65: 1475-1479.
- Moreno Switt, A. I., Y. Soyer, L. D. Warnick, y M. Wiedmann. 2009. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella* enterica serotype 4, 5, 12: i:–. *Foodborne pathogens and disease* 6: 407-415.
- Munro, P. M., G. N. Flatau, R. L. Clement, y M. J. Gauthier. 1995. Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in seawater. *Applied and environmental microbiology* 61: 1853-1858.
- Murase, T. *et al.* 1995. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiology and immunology* 39: 673-676.
- NARMS. 2014. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System Integrated Report.
- Nde, C., y C. Logue. 2008. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. *Journal of applied microbiology* 104: 215-223.
- Olsen, J. E., D. J. Brown, M. Madsen, y M. Bisgaard. 2003. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *Journal of applied microbiology* 94: 826-835.
- Park, S. H. *et al.* 2014. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food microbiology* 38: 250-262.
- Park, S. H., y S. C. Ricke. 2015. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, Salm. Enteritidis, Salm. Heidelberg and Salm. Typhimurium. *Journal of applied microbiology* 118: 152-160.
- Rasschaert, G., K. Houf, y L. De Zutter. 2007. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of applied microbiology* 103: 333-341.
- Ravel, J., I. T. Knight, C. E. Monahan, R. T. Hill, y R. R. Colwell. 1995. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiology* 141 (Pt 2): 377-383.

- Reiter, M., M. Fiorese, G. Moretto, M. López, y R. Jordano. 2007. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection*® 70: 1723-1725.
- Ren, X. *et al.* 2016. Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* enterica isolates throughout an integrated broiler supply chain in China. *Epidemiology and Infection* 144: 2989-2999.
- Robicsek, A., G. A. Jacoby, y D. C. Hooper. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 6: 629-640.
- Samuel, G., y P. Reeves. 2003. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research* 338: 2503-2519.
- Sanchez, S., C. L. Hofacre, M. D. Lee, J. J. Maurer, y M. P. Doyle. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221: 492-497.
- Seong, W. J. *et al.* 2012. Molecular serotyping of *Salmonella* enterica by complete rpoB gene sequencing. *Journal of Microbiology* 50: 962-969.
- Snow, L. C. *et al.* 2007. Survey of the prevalence of *Salmonella* species on commercial laying farms in the United Kingdom. *The Veterinary Record* 161: 471-476.
- Søborg, D. A., N. B. Hendriksen, M. Kilian, y N. Kroer. 2013. Widespread occurrence of bacterial human virulence determinants in soil and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 5488-5497.
- Sonne-Hansen, J., y S. M. Jenabian. 2005. Molecular serotyping of *Salmonella*: identification of the phase 1 H antigen based on partial sequencing of the flhC gene. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 113: 340-348.
- Soyer, Y. *et al.* 2013. Antimicrobial drug resistance patterns among cattle- and human-associated *Salmonella* strains. *Journal of Food Protection* 76: 1676-1688.
- Stevens, A. *et al.* 2008. Epidemiological analysis of *Salmonella* enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of Food Microbiology* 123: 191-197.
- Tamura, K., M. Nei, y S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11030-11035.
- Tamura, K. *et al.* 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tenover, F. C. *et al.* 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.
- Trkov, M., y G. Avguštin. 2003. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella* enterica. *International Journal of Food Microbiology* 80: 67-75.

- Tsai, L.-S., R. Higby, y J. Schade. 1995. Disinfection of poultry chiller water with chlorine dioxide: consumption and byproduct formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2768-2773.
- UNA. 2015.
- Uyttendaele, M., P. De Troy, y J. Debevere. 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *Journal of food protection* 62: 735-740.
- Uyttendaele, M., J. Debevere, R. Lips, y K. Neyts. 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 40: 1-8.
- Van Boeckel, T. P. *et al.* 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 5649-5654.
- Voss-Rech, D. *et al.* 2015. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry science* 94: 433-441.
- Waldroup, A. 1996. Contamination of raw poultry with pathogens. *World's Poultry Science Journal* 52: 7-25.
- Warton, D. I., y F. K. Hui. 2011. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92: 3-10.
- Wattiau, P., C. Boland, y S. Bertrand. 2011. Methodologies for *Salmonella* enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and environmental microbiology* 77: 7877-7885.
- White, D. G. *et al.* 2001. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *The New England journal of medicine* 345: 1147-1154.
- Wiesner, M. *et al.* 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella* enterica serovar Typhimurium strains. *BMC microbiology* 9: 1.
- Wilson, D. J. *et al.* 2008. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genetics* 4: e1000203.
- Williams, L. K. *et al.* 2008. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Broiler Chicken Related Samples Using BAX PCR and Conventional International Organization for Standardization Culture. *Journal of Food Protection* 71: 835-838.
- Winfield, M. D., y E. A. Groisman. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 69: 3687-3694.
- Woese, C. R., y G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5088-5090.
- Yang, B. *et al.* 2010. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International journal of food microbiology* 141: 63-72.
- Yang, H., Y. Li, y M. G. Johnson. 2001. Survival and death of *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken

- skin during poultry scalding and chilling. *Journal of food protection* 64: 770-776.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, y W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 7: 203-214.
- Zou, W. *et al.* 2013. Meta-analysis of pulsed-field gel electrophoresis fingerprints based on a constructed *Salmonella* database. *PloS one* 8: e59224.
- Zou, W. *et al.* 2010. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis profiles for identification of *Salmonella* serotypes. *Journal of clinical microbiology* 48: 3122-3126.