



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
**DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS.**

**ANÁLISIS MOLECULARES DE LA CO-OCURRENCIA DE**  
***Salmonella enterica* EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

**MC. IVAN DAVID REGALADO PINEDA**

DIRIGIDO POR:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE, 2021



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
**DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS.**

**ANÁLISIS MOLECULARES DE LA CO-OCURRENCIA DE**  
***Salmonella enterica* EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

**MC. IVAN DAVID REGALADO PINEDA**

DIRIGIDO POR:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Presidente

Dra. María del Pilar Castañeda Serrano

Secretaria

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Vocal

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

Suplente

Dr. René Cerritos Flores

Suplente

Universidad Autónoma de Querétaro, noviembre 2021

## Agradecimientos

A mi familia por su apoyo incondicional, a mis hijas que son mi motor de vida y a Elizabeth por siempre estar a mi lado y repetirme que no estoy sólo.

Agradezco a compañeros del laboratorio por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

Gracias al Dr. Gerardo por sus enseñanzas y apoyo.

A los integrantes del comité por su dedicación y aportaciones al presente proyecto.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Resumen

Se ha demostrado que los métodos cultivo-dependientes causan un aislamiento preferencial de serotipos de *S. enterica* generando con esto información epidemiológica errónea. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue identificar una determinante genética asociada a serotipos, que tenga el potencial para ser utilizada en un método molecular cultivo-independiente que permita identificar la diversidad de serotipos de *S. enterica*. De los 45 genes evaluados, *srfC* mostró ser específico del género *Salmonella* y con el mejor poder discriminatorio mediante el análisis bioinformático. La validación bioinformática y por PCR más secuenciación de cepas de referencia, mostraron una identificación del 100% de los serotipos evaluados. Este método se utilizó para identificar los serotipos de 210 aislamientos de *Salmonella* obtenidos de un muestreo temporal (2016 – 2018) de carne de pollo en punto de venta de supermercados y mercados públicos (N = 1160). Se identificaron 22 serotipos distintos circulando en carne de pollo, de los cuales Enteritidis, Infantis y Anatum fueron los más prevalentes (65%, 31% y 19%, respectivamente). A pesar de que la diversidad de serotipos fue similar entre los supermercados (20) y mercados públicos (17), la prevalencia de *S. enterica* fue mayor (27.2%,  $p < 0.0001$ ) en supermercados, siendo hasta 10.5 veces más probable ( $P < 0.05$ ) recuperar este patógeno en este tipo de expendios. Para soportar la idea sobre la pérdida de diversidad que existe utilizando un método convencional, se realizó un análisis cultivo-dependiente variando temperaturas de incubación de los caldos de enriquecimiento Rappaport y Tetrionato (18h, 24h, 48h y 72h) y utilizando tres agares selectivos. Se analizaron 12 piezas de pollo de cuatro supermercados, cada muestra por duplicado. La prevalencia fue del 100%. Se identificaron 5 serotipos (Enteritidis, Infantis, Braenderup, Agona y Anatum) en los 210 aislamientos obtenidos. En el 50% de las muestras estaban co-ocurriendo al menos 2 serotipos. Se observó un aislamiento preferencial de serotipos dependiendo del caldo de enriquecimiento utilizado, tiempo de incubación o agar selectivo utilizado ( $P < 0.05$ ). Estos resultados muestran que el gen *srfC* es capaz de diferenciar los serotipos de *S. enterica* prevalentes en matrices alimentarias, por lo que puede ser utilizado en métodos moleculares cultivo-independientes para determinar la diversidad de serotipos presente directamente de la muestra.

## Abstract

There is evidence suggesting that epidemiological surveillance of *S. enterica* is biased due to preferential isolation on culture-dependent methods using enrichment- and selective-media, for its characterization. Thus, the main goal of the present study was to uncover a molecular marker linked to *Salmonella* serotypes, with potential use on culture-independent approach that would reveal the whole repertoire of *S. enterica* confined in food matrices. From the analysis of 45 genes, *srfC* shown to be specific for *Salmonella* and with the best serotype discriminatory power. Bioinformatic and PCR plus sequencing test validation with different strains reference of *Salmonella* serotypes show a concordance of 100%. This method was used to genosertotyping 210 isolates of *S. enterica* obtained from the temporal sampling (2016 – 2018) chicken meat from supermarkets and wet markets (N = 1160). From 22 serotypes identified, Enteritidis, Infantis and Anatum were must prevalent serotypes circulating in broilers (65%, 31% and 19%, respectively). Similarity on serotypes diversity were found between retailers, 20 for supermarkets and 17 for wet markets. Instead, the prevalence of *Salmonella* in supermarkets were higher (27.2%,  $p < 0.0001$ ) than wet markets (9%), being 10.5 times more likely recover *S. enterica* from this type of retailer ( $P < 0.05$ ). To support the idea of the lost diversity on culture-dependent method, 12 chicken meat samples from supermarkets were analyzed in duplicate through a variation on incubation time of enrichment media (18h, 24h, 48h and 72h) and the use of 3 selective agar media. Results showed a 100% of *Salmonella* prevalence and the presence of 5 serotypes (Enteritidis, Infantis, Braenderup, Agona y Anatum) in 210 isolates. The co-occurrence with at least 2 serotypes in the 50% of the samples and the preferential serotype recuperation from enrichment media, incubation time and selective agar media ( $P < 0.05$ ), showed evidence of the loss of *S. enterica* serotypes diversity. Hence, the use of *srfC* PCR plus secuenciation could be used on a molecular culture-independent method to describe *Salmonella* serotypes diversity.

## **Declaración de Responsabilidad del Estudiante**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

## Índice

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	2
4.1. Importancia de la salmonelosis a nivel mundial .....	2
4.2. Importancia de la salmonelosis en México .....	2
4.3. Co-ocurrencia de <i>Salmonella enterica</i> en pacientes.....	3
4.4. Multi-infección en animales.....	4
4.5. Co-ocurrencia en alimentos destinados al consumo humano .....	5
4.6. Importancia de la co-ocurrencia de serotipos .....	6
4.7. Desventajas de los métodos convencionales para análisis de co-ocurrencia.....	7
4.7.1. Métodos cultivo-dependiente.....	7
4.7.2. Sesgos asociados a los métodos cultivo-dependientes para el aislamiento de <i>S. enterica</i> . .....	8
4.7.3. Co-ocurrencia por métodos cultivo-dependientes .....	10
4.7.4. Serotipificación de <i>Salmonella</i> .....	11
4.8. Métodos moleculares para la genoserotipificación de <i>S. enterica</i> .....	12
4.9. Marcadores moleculares utilizados en la genoserotipificación molecular.....	15
5. Justificación .....	18
6. Hipótesis .....	19
7. Objetivo general .....	19
7.1. Objetivos específicos.....	19
8. Metodología .....	20
8.1. Análisis temporal de la prevalencia de <i>Salmonella</i> .....	20
8.2. Aislamiento de <i>Salmonella enterica</i> por métodos cultivo-dependientes.....	21
8.3. Extracción del material genético .....	21
8.4. Identificación de <i>Salmonella</i> spp. por PCR.....	21
8.5. Análisis bioinformático para la determinación de serogrupos.....	22
8.6. Validación de la mPCR para la determinación de serogrupos.....	23
8.7. Análisis bioinformático para la identificación de la determinante genética asociada a serotipos de <i>S. enterica</i> . .....	24

8.8. Validación de la PCR con los iniciadores propuestos para el gen <i>srfC</i> .....	25
8.9. Validación del método de serotipificación molecular con el gen <i>srfC</i> . ....	25
8.10. Serotipificación Molecular .....	25
8.11. Análisis estadísticos .....	26
8.12. Análisis de rarefacción. ....	27
8.13. Evaluación de co-ocurrencia por un método cultivo-dependiente. ....	27
9. Resultados y discusión. ....	28
9.1. Análisis temporal de la prevalencia de <i>Salmonella spp</i> en cárnicos crudos.....	28
9.2. Multiplex PCR para la determinación de serogrupos .....	36
9.3. Análisis bioinformático – Determinante genética para diferenciar serotipos. ....	38
9.4. Co-ocurrencia de <i>S. enterica</i> . ....	42
9.5. Diversidad de serotipos de <i>S. enterica</i> .....	49
10. Conclusiones .....	53
11. Bibliografía .....	54
12. Anexos .....	64

## Acrónimos

ETA: Enfermedad Transmitida por Alimentos.

RV: Caldo Rappaport-Vassiliadis con soya

TT: Caldo tetrionato

TSI: Agar triple azúcar hierro.

LIA: Agar hierro lisina.

MIO: Semi agar movilidad, indol y ornitina.

XLD: Agar xilosa, lisina y desoxicolato.

HK: Agar Hektoen

VB: Agar Verde Brillante

InDRE: Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica.

*atpD*: Gen que codifica para la subunidad  $\beta$  del complejo ATP sintetasa.

*gyrB*: Gen que codifica para la subunidad  $\beta$  del ADN girasa.

*rpoB*: Gen que codifica para la subunidad  $\beta$  del ARN polimerasa.

*srfC*: Gen que codifica para un factor de virulencia en *Salmonella*.

NGS: Next Generation Sequence.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

NCBI: National Center for Biotechnology Information

BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool compares nucleotide

## Índice de Figuras

- Figura 1.-** Medios de cultivo utilizados en el método convencional para la identificación de *S. enterica*. 8
- Figura 2.-** Análisis filogenético basado en la secuenciación parcial del gen *rpoB* de *S. enterica*. El árbol filogenético se construyó utilizando el método neighbor-joining en el software MEGA (Extraído de Fresno et al. 2014). 17
- Figura 3.-** Determinación de co-ocurrencia de serotipos de *Salmonella* por un método cultivo-dependiente. Cada pieza de pollo de supermercado se trabajó por duplicado (N = 24). Los caldos de enriquecimiento Muller Kauffmann Tetratiónato con novobiocina (MKTTn) y Rappaport Vassiliadis Soya (RVS) se incubaron a 18h, 24h, 48h y 72h. Se realizó un pase por duplicado a los agares selectivos XLD, Hektoen y Verde Brillante de donde se obtuvieron las colonias morfológicamente típicas a *Salmonella* spp. 28
- Figura 4.-** Prevalencia de *Salmonella* por sitio de muestreo (A), año (B) y estación (C). Los asteriscos muestran diferencia estadística entre supermercados y mercados públicos (Prueba de Chi-cuadrada;  $P < 0.05$ ). 32
- Figura 5.-** Correlación entre la prevalencia de *Salmonella* en carne de pollo y casos de salmonelosis. El análisis se realizó utilizando los datos de prevalencia en carne de pollo versus el número de casos de salmonelosis en general (A), con los datos de prevalencia de supermercados (B) y mercados públicos (C). 36
- Figura 6.-** Imagen de los productos de amplificación de la mPCR para determinar serogrupos. En la primera línea está el DNA Ladder de 1kb, seguido de 3 amplicones del serogrupo B (serotipos Agona, Derby y Agona), 3 amplicones del serogrupo C1 (Infantis, Rissen y Braenderup), 3 amplicones del serogrupo C2 (Newport, Manhattan y Kentucky) y 2 amplicones del serogrupo E (Anatum y Give). 38
- Figura 7.-** PCR con los iniciadores dirigidos al gen *srfC* (492pb). Validación con cepas de referencia de *Salmonella*. 41
- Figura 8.-** Evaluación de 12 muestras de carne de pollo (Pierna y muslo con piel) expedidas en supermercados, a través de una variación del método convencional para el aislamiento de *Salmonella* (ISO 6579). Cada muestra se evaluó por duplicado (N=24). Los caldos de enriquecimiento Rappaport (RP) y Tetratiónato (TT) se incubaron a 18h, 24h, 48h y 72h. Los cuadros con fondo negro indican la presencia de *S. enterica*. En la parte inferior de cada el número de muestras positivas por agar selectivo utilizado (XLD, Hektoen (HK) y Verde Brillante (VB)), debajo de éstos, las sumatorias de casos positivos por caldo de enriquecimiento. 43
- Figura 9.-** Aislamiento preferencial de serogrupos (A) y serotipos (B) por tipo de caldo de enriquecimiento utilizado para su aislamiento (Rappaport (Rv) o Tetratiónato (TT). Asterisco representa significancia ( $P < 0.05$ ). 45
- Figura 10.-** Aislamiento preferencial de serotipos de *Salmonella* por agar selectivo (XLD, Hektoen o Verde Brillante) empleado (A) y horas de incubación de los caldos de enriquecimiento Rv y TT (B). Asterisco representa diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). 46
- Figura 11.-** Prevalencia y diversidad de serotipos de *Salmonella* en carne de pollo obtenidos de supermercados (SM) y mercados públicos (MP) durante un periodo de tres años (2016-2018). 50
- Figura 12.-** Variación temporal de los serotipos de *Salmonella* Enteritidis e Infantis. Los asteriscos representan diferencia significativa ( $P < 0.002$ ). 51

**Figura 13.-** Co-ocurrencia mensual de serotipos de *S. enterica* en carne de pollo. Datos obtenidos del análisis temporal (2016 – 2018) de prevalencia de *S. enterica* en supermercados y mercados públicos de Querétaro. 52

**Figura 14.-** Análisis de rarefacción sobre la diversidad de serotipos de *Salmonella* presentes en carne de pollo – análisis temporal (2016 – 2018). 53

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.-</b> Frecuencia de aislamientos de once serovares de <i>Salmonella</i> (10 UFC/mL de cada serovar) inoculados en una solución con 10 <sup>7</sup> bacterias provenientes de lavados filtrados de carne molida.	10
<b>Tabla 2.-</b> Interdependencia de la proporción de serotipos y tiempo de incubación del medio de enriquecimiento.	11
<b>Tabla 4.-</b> Investigaciones sobre serotipificación molecular, utilizando distintos genes como determinantes genéticos de diversidad en <i>Salmonella</i> .	16
<b>Tabla 5.-</b> Diseño del muestreo mensual de carne de pollo en mercados y supermercados de Querétaro.	20
<b>Tabla 6.-</b> Iniciadores utilizados en la identificación de <i>Salmonella enterica</i>	22
<b>Tabla 7.-</b> Prevalencia de <i>Salmonella</i> a través del tiempo	30
<b>Tabla 8.-</b> Efecto estacional sobre la prevalencia de <i>Salmonella</i> .	31
<b>Tabla 9.-</b> Análisis Odds ratio de la prevalencia de <i>Salmonella</i> en supermercados a través del tiempo.	33
<b>Tabla 10.-</b> Análisis Odds ratio de factores combinados sobre la prevalencia de <i>Salmonella</i> .	34
<b>Tabla 11.-</b> Iniciadores utilizados en la identificación de serogrupos de <i>S. enterica</i> .	37
<b>Tabla 12.-</b> Genes evaluados por su poder discriminatorio entre serotipos. El total representa la sumatoria de la proporción de los otros indicadores.	39
<b>Tabla 13.-</b> Identificación de serotipos a través de la secuenciación de la determinante genética <i>srfC</i> . Estos serotipos pertenecen al 20% de las cepas de referencia de <i>Salmonella</i> que se les considera difíciles de identificar, debido a que presentan 2 o más serotipos con el mismo porcentaje de identidad. En fondo gris la identificación correcta.	42
<b>Tabla 14.-</b> Co-ocurrencia de serotipos de <i>S. enterica</i> en carne de pollo de 4 supermercados.	48

## 1. Introducción

*Salmonella* es uno de los principales patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial. Provoca anualmente de 200 a 1000 millones de casos de salmonelosis alrededor del mundo, con una tasa de fatalidad de 150 mil (Chlebicz & Ślizewska, 2018). Por mucho tiempo se ha trabajado bajo la premisa que los brotes de salmonelosis en animales y humanos son causados por mono-infecciones con algún serotipo de *S. enterica*. No obstante, existe numerosa evidencia de co-ocurrencia de serotipos en muestras clínicas obtenidas de animales y humanos (Caldwell et al., 1995a; Garrido et al., 2014; Gicquelais et al., 2014; Pratap et al., 2014).

La idea de mono-infecciones por *Salmonella* es promovida por los resultados de análisis cultivo-dependientes utilizados para la detección del patógeno. Los métodos cultivo-dependientes, son vulnerables al fenómeno de aislamiento preferencial de serotipos de *S. enterica* (Davies et al., 2000; Gorski, 2012; Kafel & Bryan, 1977). Diversos estudios han demostrado que algunos serotipos de *Salmonella* son más fáciles de recuperar a partir de matrices clínicas o ambientales (Garrido et al., 2014; Gkana et al., 2017; Kafel & Bryan, 1977; Pratap et al., 2014). Esta limitación técnica podría estar generando información sesgada de la diversidad, distribución y virulencia de serotipos asociados a brotes de salmonelosis.

Por todo lo anterior es fundamental desarrollar nuevas estrategias moleculares para determinar la diversidad y distribución real de serotipos de *S. enterica* presente en muestras animales y ambientales. Estos estudios nos permitirán conocer la prevalencia, persistencia y ocurrencia real de serotipos de *S. enterica* en muestras clínicas, alimentarias y ambientales.

## 2. Antecedentes

### 4.1. Importancia de la salmonelosis a nivel mundial

Las infecciones causadas por *Salmonella enterica* son la segunda enfermedad zoonótica más frecuente en humanos. A nivel mundial, anualmente se reportan de 11-21 millones de casos (Popa & Papa, 2021). En el continente Europeo, se reportan más de 130,000 casos confirmados al año (EFSA, 2010). La principal fuente de infección son los alimentos contaminados con este patógeno, de los cuales, los productos cárnicos son responsables del ~12% de los casos de salmonelosis (EFSA, 2010). En el contexto de la Unión Europea, Portugal reporta las prevalencias más altas (65%) de *S. enterica* en carne de pollo seguido de Grecia (22.7%), República Checa (4.8%) y países como Alemania y Reino Unido en donde se reportan prevalencias menores a 0.1% (EFSA, 2010).

En los EE.UU., las autoridades sanitarias identifican a *S. enterica* como la principal bacteria causante de enfermedades transmitidas por alimentos (CDC, 2021). Anualmente, se registran entre 13,246 de casos por año (CDC, 2021). Datos reportados por el Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana (NARMS, por sus siglas en inglés) revelan una prevalencia de *S. enterica* de 5.7% en pollo (Nyirabahizi *et al.*, 2020).

### 4.2. Importancia de la salmonelosis en México

En México no se cuenta con estadísticas nacionales publicadas y recientes sobre el número de infecciones por *S. enterica*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero (Zaidi *et al.*, 2006). La falta de un sistema de vigilancia epidemiológica eficiente con una comunicación entre epidemiólogos, médicos, microbiólogos, veterinarios y sectores de agricultura, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como México pueda identificar las serovariedades de *Salmonella* en distintos puntos de riesgo para la salud de los seres humanos. Esta información es necesaria para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*, así como los costos que estas representan en distintos sectores socioeconómicos (Zaidi *et al.*, 2006).

Según datos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica en México (InDRE) a través del boletín informativo de la Secretaría de Salud (SSA), en 2019 se reportaron 116,925 casos de infecciones por *Salmonella* (Salud, 2021). En México, los alimentos de origen animal son la principal fuente de *Salmonella* (42.76%) (Contreras-Soto *et al.*, 2019) provocando hasta 1,737,439 casos de salmonelosis en un año (Salud 2021). En México los productos cárnicos crudos presentan una elevada prevalencia de este patógeno, siendo la carne de pollo la más contaminada, mostrando una prevalencia que oscila entre 35.3% (Miranda *et al.*, 2009) hasta un 47.7% (Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017).

Debido a la importancia de *Salmonella* por causar enfermedades y a la elevada prevalencia que tiene este patógeno en carne de pollo, es necesario contar con estrategias de vigilancia sanitaria para evitar brotes e implementar acciones para disminuir la incidencia de éste patógeno.

#### **4.3. Co-ocurrencia de *Salmonella enterica* en pacientes.**

Desde hace más de 80 años, se ha documentado la idea de co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en pacientes con infecciones intestinales (Harvey & Price, 1967; Hormaeche *et al.*, 1943; Olitzky *et al.*, 1956; Perera *et al.*, 2007; Pratap *et al.*, 2014). Esta co-ocurrencia también ha sido evidenciada en animales de granja (Garrido *et al.*, 2014) y alimentos (Paine *et al.*, 2014; Podolak *et al.*, 2010). La infección con múltiples serotipos de *Salmonella* en pacientes podría estar vinculada al consumo de alimentos que presentan co-ocurrencia de serotipos (Gicquelais *et al.*, 2014).

En 1943 se reportó multi-infecciones en infantes de Uruguay, comúnmente infectados por distintos serotipos de *S. enterica* como Derby, Montevideo y Anatum. Incluso se reportaron casos con 5 y hasta 10 serotipos distintos en un mismo paciente (Hormaeche *et al.* 1943).

En 1956 en New York, EE. UU. se aislaron los serotipos Bareilly, Muenchen y Montevideo en una niña de 2 años. Los familiares de la niña no presentaban síntomas de salmonelosis; sin embargo, se demostró que eran portadores asintomáticos. Del papá de la niña, se aisló el

serotipo Kentucky; de la mamá, Bareilly; de la hermana de 7 años, Bareilly, Muenchen, y Senftenberg; y del hermano de 8 años, Bareilly y Senftenberg (Olitzky *et al.*, 1956).

Otro estudio realizado en la India, mostró que, de 29 pacientes diagnosticados con fiebre tifoidea, 10 presentaron co-infección con los serotipos Typhi y Paratyphi A (Pratap *et al.* 2014). En Inglaterra, una persona que viajó de la India mostró síntomas de gastroenteritis días después de arribar a su destino. En este paciente se aislaron 2 serotipos de *Salmonella*; Typhi y Paratyphi A, (Perera *et al.* 2007). En Pakistán, se reportaron dos casos de multi-infección por distintos serotipos de *S. enterica*. Dos niñas menores de 6 años fueron infectadas por Typhi y Paratyphi A (Sultan *et al.* 2013).

Se ha reportado co-infección de los serotipos Typhi y Paratyphi A en el 60% (28/46) de pacientes con fiebre tifoidea en India (Pratap *et al.*, 2014). El tratamiento se dificulta en este tipo de pacientes con infecciones múltiples, debido a que los distintos serotipos de *S. enterica* muestran una resistencia diferencial a los antibióticos. (Sultan *et al.* 2013; Hormaeche *et al.* 1943; Perera *et al.* 2007).

#### **4.4. Multi-infección en animales**

En animales utilizados para la producción de alimentos también se han reportado una variedad de casos de multi-infecciones por distintos serotipos de *S. enterica*. En granjas porcinas de EE. UU., se identificó multi-infecciones causadas por los serotipos Mbandaka, Typhimurium, Heidelberg y Derby (Davies *et al.* 1999), en granjas porcinas de España, se identificó Typhi y Paratyphi (Garrido *et al.* 2014) y en ganado y ovejas de Australia se observaron infecciones causados por Anatum, S. Havana y Typhimurium (Samuel *et al.* 1981).

También se han reportado números casos de co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en las unidades de producción animal. En una granja porcina de EE. UU. se aislaron los serotipos Typhimurium, Muenster, Mbandaka y Worthington a partir de excretas de cerdos. En muestras de suelo, también se identificó Typhimurium y Mbandaka. (Funk *et al.* 2001).

En un estudio realizado a 31 granjas de pollo, se determinó una diversidad de 25 serotipos de *S. enterica* circulando en estas granjas. De las 222 muestras analizadas, en 10 de sus muestras se encontraron co-ocurrencia de 2 serotipos y en una de 3 serotipos (Caldwell *et al.*, 1995). A pesar de que en este estudio la co-ocurrencia de serotipos fue del 5%, es importante hacer notar que el hallazgo de co-ocurrencia fue casual, derivado del esfuerzo de muestreo.

En otro estudio realizado en Estados Unidos se colectaron muestras ambientales y de heces a lo largo de la cadena de producción de criaderos de cerdo. Se obtuvieron un total de 1090 aislamientos de *Salmonellas*, 4% (66) fue de las heces y 11.7% (156) de muestras ambientales. Se identificaron un total de 24 serotipos, de los cuales los más abundantes fueron *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Infantis* y *S. Derby*. Los serotipos mostraron un patrón distinto a la resistencia antimicrobiana. El mayor porcentaje de resistencia fue a tetraciclina (71%), seguido de sulfisoxazole (42%), y streptomycin (17%). El 50% (7/14) de los cerdos de engorda evaluados mostraron una infección simultánea por 2 o 3 serotipos de *S. enterica*. Estos serotipos mostraron un patrón diferente a la resistencia de antibióticos, lo que podría tener implicaciones inmunológicas en la relación patógeno-huésped (Garrido *et al.* 2014).

#### **4.5. Co-ocurrencia en alimentos destinados al consumo humano**

En Nueva Zelanda se identificó un brote por casos de salmonelosis. El estudio realizado por las autoridades sanitarias permitió identificar el Tahini importado como la fuente de origen de la contaminación, encontrando hasta 3 serotipos de *Salmonella* (Mbandaca, Montevideo y Maastricht) circulando al mismo tiempo en este producto. Fueron 27 pacientes enfermos a los que se les detectó al menos uno estos serotipos. La caracterización genética por la técnica PFGE, mostró que los pulsotipos de los aislamientos de Tahini corresponden a los identificados en los pacientes (Paine *et al.* 2014). Estos datos aportan evidencia sobre la capacidad que tienen las muestras contaminadas con distintos serotipos para causar monoinfecciones o co-infecciones.

En Alemania hubo un brote que provocó 1000 casos de salmonelosis. El producto que causó el brote fue la paprica, condimento en polvo utilizado en papas fritas. Se determinó que este producto estaba contaminado con tres serotipos de *Salmonella*; Saintpaul, Rubislaw y

Javiana, los cuales fueron aislados de la paprica, la paprica en polvo, las papas fritas condimentadas con la paprica y de pacientes (Lehmacher *et al.*, 1995).

En conjunto estos estudios evidencian la co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en matrices alimentarias y pacientes. Sin embargo, los estudios de co-ocurrencia no son comunes, debido al elevado costo y tiempo requerido para su análisis (Harvey & Price, 1967).

#### **4.6. Importancia de la co-ocurrencia de serotipos**

Sabemos que la co-ocurrencia de serotipos de *Salmonella* es un fenómeno que existe en animales, humanos y alimentos (Garrido *et al.*, 2014; Gunn *et al.*, 2014; Podolak *et al.*, 2010). Existen diferencias entre serotipos, y éstas pueden favorecer la prevalencia, persistencia y patogenicidad de *Salmonella*. Se ha demostrado que algunos serotipos pueden ser mayormente identificados a través de los métodos cultivo-dependientes (Gorski, 2012; Kafel & Bryan, 1977; Thompson *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Kafel y Bryan, se evaluaron a través de 48 variaciones del método cultivo-dependiente, 992 muestras inoculadas con 11 serotipos de *S. enterica*. Como resultado de este análisis, se identificaron serotipos mayoritarios como Typhimurium (60.9 %), London (55 %) y Senftenberg (54.2 %) y serotipos minoritarios Newport (8.69 %), Pullorum (4 %), y Abortus-ovis (1 %) (Kafel & Bryan, 1977). Esta dominancia de ciertos serotipos se presenta en los métodos cultivo-dependientes a pesar de que los aislamientos de *S. enterica* presenten una sintética de crecimiento similar y se encuentren en la misma concentración inicial (Gorski, 2012).

En un estudio se evaluaron 4 estanques de agua en la bahía de Chesapeake. En los dos años de estudio (2014 - 2015) el estanque que mostró una mayor prevalencia (32 %) de *S. enterica* fue el estanque con mayor diversidad de serotipos (8 serotipos) y con mayor abundancia de individuos (1.5 log NMP/L) en comparación con el de menor prevalencia (12 %), en el cual se identificaron 3 serotipos con cargas bacterianas de 0.5 log NMP/L (Gu *et al.*, 2019). Se ha sugerido que ambientes altamente contaminados por una diversidad de serotipos, son mayormente persistentes en el ambiente (Winfield & Groisman, 2003) y pueden incluso provocar cambios en la composición de especies de la biota nativa (Gu *et al.*, 2019; Schierstaedt *et al.*, 2020).

En la actualidad existe una creciente preocupación por la multiresistencia a antibióticos presente en *Salmonella*. Uno de los factores asociados a esta multiresistencia es el uso de antibióticos en animales de granja. En este sitio se ha observado el 100 % (12/12) de aislamientos de *Salmonella* con multiresistencia a por lo menos 5 antibióticos, en comparación con el 4 % (4/19) observado en aves de traspatio (Nair *et al.*, 2018). La coexistencia de serotipos de *Salmonella* con distintos patrones de multiresistencia es otro fenómeno que se ha observado en animales de granja, siendo este un fenómeno recurrente ((78.6 %)11/14) (Garrido *et al.*, 2014). Este fenómeno podría favorecer la propagación de elementos genéticos móviles entre las bacterias (Oladeinde *et al.*, 2019) y tener con ello un impacto epidemiológico importante.

Cuando un huésped es infectado por dos o más de estos serotipos multiresistentes, la enfermedad puede ser más severa y dificultar su tratamiento (Olitzky *et al.*, 1956; Pratap *et al.*, 2014). Se ha observado que la severidad de la enfermedad o la mortalidad es un factor que depende del serotipo, en donde se ha identificado a *Choleraesuis* como el serotipo mayormente asociado (60 %) a hospitalizaciones, mientras que los serotipos Dublin (3 %) y Typhimurium (0.6 %) están asociados a una mayor tasa de mortandad (Jones *et al.*, 2008).

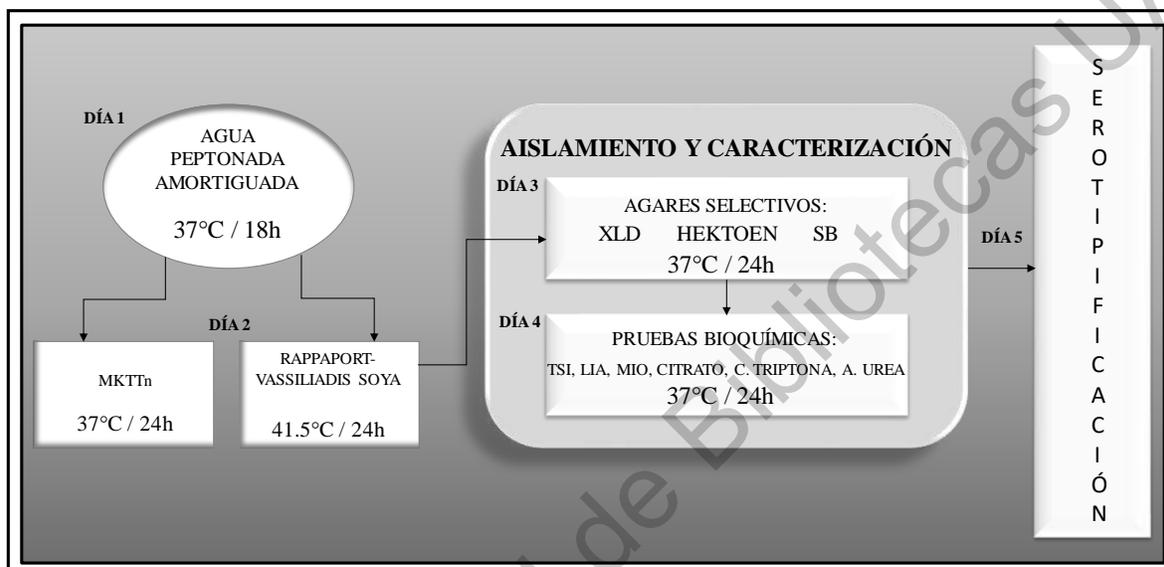
La co-ocurrencia de serotipos de *Salmonella* es un fenómeno del cual se conoce poco. Su identificación requiere un aumento de insumos y tiempo dedicado para su identificación (Berghaus *et al.*, 2013; Pratap *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha observado que es un fenómeno altamente frecuente ((91%) 20/22) en pollos (Thompson *et al.*, 2018).

#### **4.7. Desventajas de los métodos convencionales para análisis de co-ocurrencia**

##### **4.7.1. Métodos cultivo-dependiente**

Los métodos convencionales cultivo-dependientes se basan en características fenotípicas para la identificación de los aislamientos. La identificación a nivel de serotipo se realiza a un solo aislamiento (Wattiau *et al.*, 2011). Estos métodos requieren aproximadamente entre 5 y 10 días para tipificar los aislamientos. Se utilizan medios de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, selectivos para la obtención de los aislamientos, así como de una serie

reacciones bioquímicas (**Figura 1**) basadas en el metabolismo de azúcares y la descarboxilación o desaminación de aminoácidos (Popoff *et al.* 2004). Este método ha sido utilizado desde los años 40's (Hormaeche *et al.* 1943) con numerosas modificaciones (Manafi, 2000; van der Zee, 1994).



**Figura 1.-** Medios de cultivo utilizados en el método convencional para la identificación de *S. enterica*.

Una de las desventajas de este método, es el tiempo de realización de la prueba. Se ha demostrado que, a través de técnicas moleculares, el tiempo de identificación de una muestra positiva se reduce de 10 días a 14h (Chin *et al.*, 2017).

#### 4.7.2. Sesgos asociados a los métodos cultivo-dependientes para el aislamiento de *S. enterica*.

Diferencias en medios de cultivo y temperaturas de incubación son factores que influyen directamente en los serotipos recuperados de muestras ambientales (Kafel & Bryan, 1977). La recuperación de serotipos como Newport, Enteritidis y Typhimurium en caldos de enriquecimiento Tetracionato o Rappaport, ha mostrado variabilidad. Esta dependerá del medio utilizado, así como del tiempo de incubación. En cualquiera de estos escenarios, *S.*

Newport mostró ser más ( $P < 0.0001$ ) prevalente con el 96% (23/24) de recuperación de los ensayos, mientras que Enteritidis 70.8 % (17/24) y Typhimurium 4.1% (1/24) (Singer *et al.*, 2009).

En muestras cárnicas se demostró que el uso de caldo selectivo de Rappaport a 42 °C obtuvo 25% más de muestras positivas a *S. enterica* que el mismo caldo selectivo incubado a 37 °C (Roberts *et al.* 1975). Este mismo fenómeno se reportó en caldo Tetrionato, resultando en 16% más muestras positivas a *S. enterica* cuando se incubaba a 42 °C, en comparación con 37 °C de incubación (Davies *et al.* 2000).

Un estudio realizado por Trichopoulos y colaboradores mostró diferencias en la prevalencia de *S. enterica* por medio de cultivo empleado para la recuperación de aislamientos en muestras fecales. En caldo Rappaport se obtuvo 62% de muestras positivas, mientras que en caldo cerebro-corazón el 51% y en caldo Tetrionato el 40% (Trichopoulos *et al.* 1975).

En un estudio se evaluaron 48 combinaciones distintas del método cultivo-dependiente para el aislamiento de *S. enterica*. Se utilizaron distintos medios de enriquecimiento (Tetrionato, Selenito y Caldo Bilis), se combinaron tiempos (18h y 24h), temperaturas (37°C y 43°C) y la atmósfera (aeróbica y anaeróbica) durante la incubación, y se realizó un segundo pase en alguno de los caldos de enriquecimiento previamente mencionados. Bajo estas condiciones se evaluaron 576 muestras inoculadas con una mezcla en iguales proporciones de 11 serotipos distintos de *Salmonella* (**Tabla 1**). Se encontró que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los porcentajes de recuperación de *S. enterica* entre los distintos métodos empleados. Por otra parte, se identificaron serotipos que únicamente se aislaron de un medio de enriquecimiento. Los serotipos abortus-ovis y Pullorum sólo se aislaron de caldo Tetrionato, mientras que Newport sólo se aisló de caldo Bilis. A pesar de que las 576 contenían los inóculos de los 11 serotipos de *Salmonella*, el porcentaje más alto de recuperación fue de Typhimurium con el 60.9 % (**Tabla 1**) (Kafel & Bryan, 1977). Esto indica que a pesar del esfuerzo de muestreo y las distintas combinaciones empleadas para la recuperación de aislamientos, es difícil obtener la diversidad neta en muestras contaminadas con distintos serotipos. Además, se pudo observar que existen serotipos dominantes, y que,

independientemente del método empleado para la recuperación de aislamientos, están presentes en altas concentraciones, de tal manera que se facilita su identificación. Otro punto importante por resaltar es la presencia de serotipos minoritarios, que, a pesar de las 48 distintas combinaciones del método, no se pudieron aislar con frecuencia.

**Tabla 1.-** Frecuencia de aislamientos de once serovares de *Salmonella* (10 UFC/mL de cada serovar) inoculados en una solución con  $10^7$  bacterias provenientes de lavados filtrados de carne molida.

Serovar	No. De aislamientos	Total de muestras	% Positivas
S. Typhimurium	351	576	60.9
S. London	317	576	55
S. Senftenberg	312	576	54.2
S. Brandenburg	275	576	47.7
S. Anatum	83	576	43.2
S. Montevideo	242	576	42
S. Rostock	172	576	29.8
S. Cholerae-suis	160	576	27.8
S. Newport	51	576	8.9
S. Pullorum	23	576	4
S. Abortus-ovis	6	576	1

Datos extraídos de: (Kafel & Bryan, 1977).

#### 4.7.3. Co-ocurrencia por métodos cultivo-dependientes

Para determinar la presencia de múltiples serotipos en pacientes, se ha utilizado la premisa de identificar no menos de 40 colonias por paciente. Incluso colonias en una misma placa, no se consideran del mismo serotipo (Hormaeche *et al.* 1943). Un método diferente utilizado para identificar la diversidad representativa de serotipos de *S. enterica* en una muestra ambiental, es el uso de distintos tiempos de incubación en caldos enriquecidos. Para corroborar la efectividad de este método, Harvey y Price analizaron una muestra naturalmente contaminada por *Salmonella*. Del caldo de enriquecimiento incubado a 43°C se tomaron alícuotas a las 5h, 18h, 24h, 48h y 72h de incubación. Cada alícuota se extendió en una placa de agar selectivo y esta se incubó a 37°C / 48h. Se colectaron y tipificaron a

nivel de serotipo 48 colonias de las 5 temperatura utilizadas. Los porcentajes de recuperación para cada serotipo identificado se muestran en la **Tabla 2** (Harvey & Price, 1967).

**Tabla 2.-** Interdependencia de la proporción de serotipos y tiempo de incubación del medio de enriquecimiento.

Serotipo	Porcentaje de 48 colonias seleccionadas a distintos tiempos de incubación				
	5h	18h	24h	48h	72h
<i>S. derby</i>	0	0	2	29	4
<i>S. enteritidis</i>	0	27	0	0	0
<i>S. newport</i>	0	0	0	10	0
<i>S. oranienburg</i>	0	15	17	4	6
<i>S. reading</i>	0	2	4	8	81
<i>S. typhimurium</i>	0	56	77	47	8

Datos extraídos de (R. W. Harvey & Price, 1967)

Se identificaron co-ocurriendo en la muestra analizada 6 serotipos. Es interesante resaltar que esta diversidad de serotipos no se pudo haber identificado utilizando solo una temperatura de incubación del caldo de enriquecimiento.

Otros estudios sugieren realizar el procedimiento convencional cultivo-dependiente, y en los agares selectivos tomar al menos 6 colonias para realizar la identificación a nivel de serotipo (Garrido *et al.*, 2014).

#### 4.7.4. Serotipificación de *Salmonella*

La tipificación de aislamientos de *S. enterica* ha sido una herramienta fundamental en epidemiología para identificar asociaciones biológicas entre bacterias, el ambiente y su huésped (Olsen *et al.* 1993). La clasificación a nivel de serotipos nos ayuda a identificar rutas de transmisión, portadores y reservorios (Olsen *et al.* 1993).

El método de tipificación más conocido y usado es la serotipificación, basada en la composición de lipopolisacáridos de la pared celular y proteínas presentes en la

conformación estructural de flagelos. A este tipo de clasificación se le conoce como esquema de Kauffmann-White (Popoff *et al.* 2004). Esta técnica es considerada el método estándar de oro para la serotipificación de *Salmonella*. Sin embargo, algunos sueros pueden no ser tan sensibles (89%) o específicos (91%), incluso se ha observado reacción cruzada entre los sueros Z<sub>4</sub>, Z<sub>4</sub>Z<sub>23</sub>, Z<sub>24</sub> y Z<sub>32</sub> (Schrader *et al.* 2008). Además, no cualquier laboratorio puede tener los 46 O antígenos y los 114 H antígenos necesarios para identificar serotipos (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

El objetivo de la serotipificación es servir como un tipo de clasificación primaria para identificar el origen, distribución y relación patógeno-huésped de cepas de *Salmonella*. Este método fue propuesto en los años 60's. Actualmente, existen más de 2500 serotipos y menos de 100 se han relacionados con infecciones en humanos (CDC, 2020).

Numerosas publicaciones han documentado las limitaciones de la serotipificación en estudios epidemiológicos. Por ejemplo, en las evaluaciones globales de serotipificación realizados por la OMS, sólo 76% de los Laboratorios Nacionales de Referencia a nivel mundial completaron la evaluación y sólo 82% de las cepas fueron serotipificadas correctamente. El rango de cepas correctamente serotipificadas varió entre 12.5% y 100% (Hendriksen *et al.* 2009).

Otras desventajas de la serotipificación incluyen el alto costo del ensayo, tiempos largos de procesamiento, necesidad de personal altamente entrenado, escases de algunos sueros en regiones, la variabilidad en calidad de sueros y el costo asociado a mantener una colección completa de sueros (Herrera *et al.* 2004; McQuiston *et al.* 2004; Achtman *et al.* 2012).

#### **4.8. Métodos moleculares para la genoserotipificación de *S. enterica*.**

Se han desarrollado distintos métodos para la genoserotipificación de *Salmonella*. Algunos de ellos se basan en la identificación de un serotipo de interés. En Korea, se ha desarrollado una PCR específica para identificar *S. Infantis*, la cual se ha convertido en un problema para la salud pública en aquella región, y uno de los serotipos más prevalentes en carne de pollo. A través de un análisis bioinformático del pangenoma de *Salmonella*, se identificó el marcador genético SIN\_02055 específico para este serotipo. Utilizando este marcador

genético en una PCR de tiempo real, se logró identificar el serotipo Infantis entre otros 59 serovares distintos, con una eficacia del 95.76 % (Yang *et al.*, 2021).

En otro estudio, se desarrolló una PCR multiple (mPCR) para la identificación de los serotipos Typhimurium y Enteritidis. A través de un análisis bioinformático, se determinaron secuencias específicas para cada uno de estos serotipos. Los iniciadores identificados a estas secuencias específicas fueron stm-4495 para Typhimurium y sen-1392 para Enteritidis. Para la validación de la mPCR se utilizaron 120 cepas de *Salmonella* y 23 de otro tipo de bacterias. De las cepas de *Salmonella* seis eran Typhimurium y tres Enteritidis, el resto pertenecen a otro serotipo. Se utilizaron iniciadores (FS23) dirigidos al gen *srfC* para confirmar que las 120 cepas pertenecían a *Salmonella*. La mPCR resultó ser específica para identificar estos serotipos (100 %) y mostró ser más sensible que otros métodos moleculares previamente reportados, identificando 500 ng (105 UFC) y 0.1pg/PCR para Typhimurium y 3pg (350 UFC)/PCR para Enteritidis ( Liu *et al.*, 2012). La identificación de estos serotipos se realiza directamente de la incubación de 12h de los caldos de enriquecimiento, permitiendo emitir un resultado en aproximadamente 14h.

Otros métodos empleados para la genoserotipificación se basan en microarreglos. En Canadá se realizó un estudio para evaluar un microarreglo comercial “Check&Trace *Salmonella*” basado en distintos marcadores genéticos vinculados a serotipos de *S. enterica*. Se evaluaron por este método y por serotipificación convencional 1028 cepas de *Salmonella* pertenecientes a 147 serotipos. La concordancia de resultados fue de 88.7 % y 9.8 % resultaron en resultados inconclusos (Ferrato *et al.*, 2017).

Existen otros métodos empleados para la identificación de serotipos de *Salmonella*, como la cromatografía líquida de desnaturalización de alto rendimiento (DHPLC) es una técnica nueva, la cual utiliza una formación heteroduplex entre un DNA estándar y un DNA mutado para identificar mutaciones. Las moléculas heteroduplex son separadas a moléculas homoduplex a través de un análisis par iónico reversa en una cromatografía de fase líquida, en la que se utiliza una columna especial generando calentamiento parcial para desnaturalizar las hebras de DNA. Este proceso ha permitido identificar mutaciones en ciertos genes como

*gyrB* y esto permitiría utilizar las variaciones del gen para identificar subespecies e incluso serotipos de *Salmonella* (Gupta *et al.* 2016).

La secuenciación es una herramienta molecular que ha revolucionado los estudios microbiológicos, permitiendo secuenciar todo el genoma de un organismo (WGS). Este método ha mostrado tener mejor sensibilidad, especificidad y una resolución en menor tiempo, comparado con los métodos de subtipificación que se utilizan como “prueba de oro” (Nadon *et al.* 2017). Otra fortaleza del WGS es su capacidad para probar distintas tesis in-silico, por ejemplo, identificación de genes de virulencia o resistencia antibiótica. (Nadon *et al.* 2017).

Recientemente, se han utilizado las Repeticiones Palindrómicas Cortas Regularmente Interespaciadas (CRISPER) o genes asociados a CRISPER (CRISPER-Cas) para realizar estudios de filogenómica en *Salmonella* (Kushwaha *et al.*, 2020). El CRISPER loci en *Salmonella* consiste de CRISPER 1 y CRISPER 2, y el contenido de interespacios entre estos dos es considerado como específico del serotipo (Thompson *et al.*, 2018). Se ha desarrollado una técnica basada en la secuenciación de CRISPER loci y el posterior análisis de sus secuencias en la base de datos de CRISPR-SeroSeq. Esta técnica se desarrolla a partir de caldos de pre-enriquecimiento, en donde se toman 1.5 mL del caldo para extraer el ADN y realizar una PCR con iniciadores que flanquean CRISPER loci, y una segunda PCR con secuencias barcode para llevar a cabo la secuenciación mediante Illumina Miseq (Thompson *et al.*, 2018). En un estudio analizaron por este método 22 muestras de pollo, de las cuales se determinó la presencia de 4 serotipos (Montevideo, Kentucky, Enteritidis y Typhimurium). Se identificó co-ocurrencia de serotipos en el 91% de las muestras, en donde se observaron hasta 4 distintos serotipos presentes en una misma muestra. Estas muestras de pollo se analizaron a la par por el método convencional, en donde se pudieron determinar únicamente a los serotipos mayoritarios (Montevideo y Kentucky), los cuales son coincidentes con los identificados en el análisis de secuencias CRISPR-SeroSeq (Thompson *et al.*, 2018).

En la actualidad, la industria de alimentos demanda nuevas alternativas para la identificación y rastreabilidad oportuna de patógenos en alimentos. Un cambio substancial como la utilización de métodos moleculares en las estrategias microbiológicas de muestreo y análisis, permitirán tomar decisiones oportunas que beneficiarán a la industria (Bergholz *et al.* 2014).

#### **4.9. Marcadores moleculares utilizados en la genoserotipificación molecular.**

Por más de 80 años, la tipificación de *S. enterica* se ha llevado a cabo mediante el uso de sueros para determinar antígenos somáticos O (lipopolisacáridos en pared celular), proteínas flagelares y el factor Vi de virulencia (Olsen *et al.* 1993). Lo que se conoce sobre la distribución, portadores específicos, reservorios naturales y prevalencia de *S. enterica* en animales, alimentos y ambiente está centrado primordialmente en la identificación de serotipos (Galanis *et al.* 2006).

En los últimos 10 años, se ha propuesto la tipificación de *S. enterica* a través de la caracterización de determinantes genéticas asociadas a serotipos. A esta estrategia se la denominado *serotipificación molecular* (Sabat *et al.* 2013) o *genoserotipificación* (Franklin *et al.* 2011; Yoshida *et al.* 2014). Numerosos estudios han evidenciado el uso exitoso de determinantes genéticas para estudios de diversidad de serotipos de *S. enterica* en muestras obtenidas de animales y humanos (**Tabla 3**).

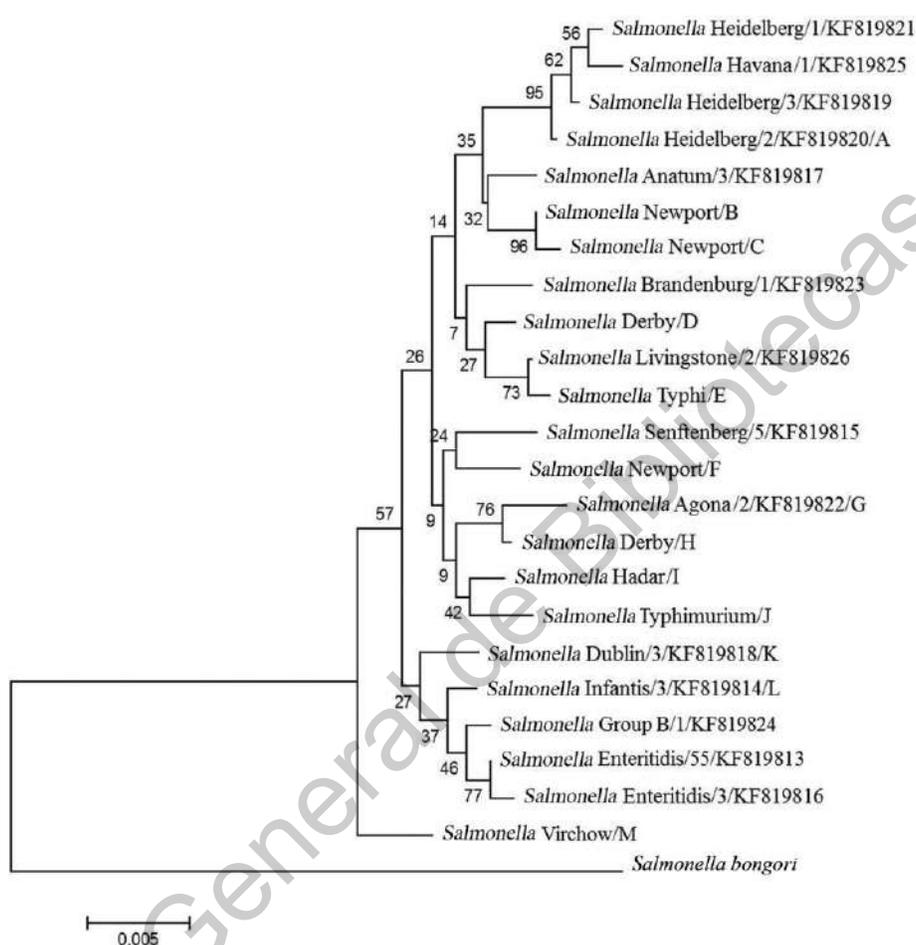
**Tabla 3.-** Investigaciones sobre serotipificación molecular, utilizando distintos genes como determinantes genéticos de diversidad en *Salmonella*.

REFERENCIA	GENES INVOLUCRADOS	No. TOTAL DE CEPAS	No. DE SEROTIPOS IDENTIFICADOS / TOTAL	MÉTODO UTILIZADO
Braun <i>et al.</i> 2012	<i>invA</i> , <i>galF</i> y <i>manC</i>	132	117 / 132	MICROARREGLO
Sonne-Hansen y Jenabian 2005	<i>fliC</i>	51	45 / 51	PCR + SECUENCIACIÓN
Seong <i>et al.</i> 2012	<i>rpoB</i>	191	60 / 77	PCR + SECUENCIACIÓN
Seong <i>et al.</i> 2012	<i>aroC</i> , <i>dnaN</i> , <i>hemD</i> , <i>hisD</i> , <i>purE</i> , <i>sucA</i> , y <i>thrA</i>	191	49 / 77	MLST
Fresno <i>et al.</i> 2014	<i>rpoB</i>	128	21 / 24	PCR + SECUENCIACIÓN
Christensen y Olsen 1998	<i>atpD</i>	18	18 / 18	PCR + SECUENCIACIÓN
Tankouo <i>et al.</i> 2007	<i>gyrB</i> , <i>atpD</i> , <i>fliC</i> y <i>fljB</i>	74	60 / 74	MLST
Tankouo <i>et al.</i> 2008	<i>gyrB</i> , <i>atpD</i> , <i>fliC</i> y <i>fljB</i>	148	24 / 27	MICROARREGLO
Adhami <i>et al.</i> 2008	<i>fimA</i> , <i>mdh</i> , <i>invA</i> , y <i>atpD</i>	17	17 / 17	SSCP
Franklin <i>et al.</i> 2011	<i>viaB</i> , <i>fliC</i> , <i>fljB</i> , <i>invA</i> + 66 sondas <i>wxy</i> y <i>wxz</i>	287	122 / 133	MICROARREGLO
Yoshida <i>et al.</i> 2016	<i>nupC</i> , <i>rfbE</i> , <i>pepT</i> , + 87 sondas	321	136 / 143	MICROARREGLO
Yoshida <i>et al.</i> 2014	<i>nupC</i> , <i>rfbE</i> , <i>pepT</i> , + 87 sondas(O + H)	1874	1812 / 1874	MICROARREGLO

El método más utilizado en la serotipificación molecular es el micro-arreglo. Estos se han desarrollado a partir de secuencias de genes involucrados en la serotipificación (Tankouo-Sandjong *et al.* 2008). Los genes *wzx* y *wzy*, están relacionados con los antígenos somáticos O. Los primeros sintetizan lipasas, mientras que los otros están involucrados en la síntesis de polimerasas. Además se han utilizados genes involucrados con la síntesis de proteínas flagelares como *fliC*; involucrado en la primera fase flagelar, y *fljB*; implicado en la segunda fase flagelar (Wattiau *et al.* 2011). También se han utilizado exitosamente los genes *invA*, *galF*, *manC*, *gyrB*, *mdh* y *atpD* para determinar los diferentes serotipos moleculares de *S. enterica* (Braun *et al.* 2012; Tankouo-Sandjong *et al.* 2007; Tankouo-Sandjong *et al.* 2008; Seong *et al.* 2012; Adékambi, Drancourt, y Raoult 2009; Christensen y Olsen 1998).

Existen muchos otros genes utilizados en la identificación de *Salmonella*, sin embargo, no han sido evaluados por su capacidad para diferenciar entre serotipos. Algunos de estos marcadores genéticos son *hila* (Borges *et al.*, 2019), *pepT* (Franklin *et al.*, 2011), *avrA*, *spvC*, *sefA*, *sopE*, *sivH* (Borges *et al.*, 2013), *rfbE* (C. Yoshida *et al.*, 2014), *sipB*, *sipC* (Ziemer y Steadham 2003), *srfC* y *yhgE* (Zou *et al.*, 2016).

El análisis molecular de las determinantes genéticas de *S. enterica* asociadas a serotipos, podrían servir para realizar análisis filogenéticos (**Figura 2**) e incluso identificar asociaciones ecológicas como patógeno - huésped (Fresno *et al.* 2014).



**Figura 2.-** Análisis filogenético basado en la secuenciación parcial del gen *rpoB* de *S. enterica*. El árbol filogenético se construyó utilizando el método neighbor-joining en el software MEGA (Extraído de Fresno *et al.* 2014).

La identificación y validación de determinantes genéticas asociadas a serotipos se ha realizado desde hace ya casi 20 años (**Tabla 3**), en donde la profundidad y robustez de los análisis mejora a medida que se incrementa la cantidad de genes y genomas secuenciados, lo que permite mejorar las bases de datos. Hoy en día, existen más de 12,290 genomas secuenciados de *S. enterica* y depositados en el GenBank. Esta gran cantidad de información genómica ofrece una excelente oportunidad para la validación de determinantes genéticas asociados a serotipos de *S. enterica*.

Una determinante genética capaz de diferenciar entre serotipos de *S. enterica*, permitiría evaluar el fenómeno de co-ocurrencia de serotipos, y con ello, el efecto de interacciones entre esta co-ocurrencia sobre la persistencia, prevalencia, multiresistencia y la interacción con su huésped.

## **5. Justificación**

La tipificación de aislamientos de *S. enterica* es fundamental en estudios epidemiológicos para identificar bases de la relación patógeno-hospedador. Sin embargo, se ha demostrado extensamente que los métodos cultivo-dependientes son vulnerables al fenómeno de aislamiento preferencial de serotipos de *S. enterica*, generando información sesgada de la diversidad y prevalencia de serotipos presentes muestras alimentarias, clínicas y ambientales. Esta limitante técnica restringe nuestro conocimiento de la diversidad y biología de este patógeno; el cual sólo está fundamentado en serotipos de *S. enterica* fáciles de aislar.

Por todo lo anterior, la presente propuesta se enfocará en desarrollar métodos cultivo-independientes para examinar la diversidad y co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en matrices alimentarias. Específicamente, se implementarán ensayos moleculares para la secuenciación y caracterización de determinantes genéticas asociadas a serotipos de *S. enterica*. Estos estudios nos permitirán conocer la prevalencia, persistencia y ocurrencia real de serotipos de *S. enterica* en muestras clínicas, alimentarias y ambientales; información fundamental para incrementar nuestro conocimiento de la biología del patógeno y establecer nuevas hipótesis de las interacciones patógeno-hospedador.

## 6. Hipótesis

El análisis de determinantes genéticas asociadas a serotipos proveerá evidencia molecular de la co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en matrices alimentarias.

## 7. Objetivo general

Desarrollar, validar e implementar ensayos moleculares para identificar la co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en matrices alimentarias.

### 7.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* y las limitantes técnicas para su determinación mediante un método cultivo-dependiente.
2. Identificar y validar determinantes genéticas capaces de discernir entre distintos serotipos de *S. enterica*.
3. Identificar la diversidad de *Salmonella* a través de un método cultivo-dependiente temporal (>2 años) de prevalencia en productos cárnicos crudos.
4. Establecer una base de datos de *S. enterica* para identificar los genotipos que se encuentran circulando en alimentos.

## 8. Metodología

### 8.1. Análisis temporal de la prevalencia de *Salmonella*.

La colecta de muestras se llevó a cabo en 5 supermercados y 5 mercados públicos en la ciudad de Querétaro. En estos puntos de venta se distribuyen piezas destazadas de pollo. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y se llevaron al laboratorio para su procesamiento en un periodo de tiempo no mayor a 4h.

El muestreo se llevó a cabo del 2016 al 2018, se colectaron mensualmente muestras de carne de pollo (*Pierna y muslo con piel*). Se colectaron en total 1160 muestras, de las cuales, en 2016 se colectaron 680 muestras y en 2017 y 2018 se colectaron 240 muestras por año (**Tabla 4**).

**Tabla 4.-** Diseño del muestreo mensual de carne de pollo en mercados y supermercados de Querétaro.

Año	Mes	Muestras	Supermercado 1	Supermercado 2	Supermercado 3	Supermercado 4	Supermercado 5	Mercado Público 1	Mercado Público 2	Mercado Público 3	Mercado Público 4	Mercado Público 5	Total
2016	Enero	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Febrero	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Marzo	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Abril	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Mayo	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Junio	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Julio	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Agosto	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Septiembre	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Octubre	64	8	8	8	8	-	8	8	8	8	-	64
2016	Noviembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2016	Diciembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Enero	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Febrero	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Marzo	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Abril	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Mayo	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Junio	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Julio	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Agosto	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Septiembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Octubre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Noviembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2017	Diciembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Enero	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Febrero	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Marzo	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Abril	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Mayo	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Junio	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Julio	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Agosto	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Septiembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Octubre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Noviembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
2018	Diciembre	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
		<b>1160</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>52</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>52</b>	<b>1160</b>

## **8.2. Aislamiento de *Salmonella enterica* por métodos cultivo-dependientes**

El análisis convencional para el aislamiento e identificación de *Salmonella* se realizó mediante una variante del método estipulado en la ISO 6579. Se tomaron 25 g de la muestra y se vertieron en 225 mL de Agua Peptonada Amortiguada (APA), la cual se incubó a 37°C / 24h. Posteriormente se realizó un pase a caldos selectivos vertiendo 0.1 mL al caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y 1 mL al caldo de Tetrionato (TT); éste último adicionado previamente con 0.2 mL de yodo-yoduro. El caldo TT se incubó a 37°C / 24h en seco y el RV a 42°C / 24h en un termobañó. Se tomó una alícuota de estos caldos y se transfirió en el agar selectivo Agar Xilosa, Lisina y Desoxicolato (XLD), el cual se incubó a 37°C / 24h. Posteriormente, se tomaron colonias sospechosas para *Salmonella*; colonias translúcidas con precipitado de H<sub>2</sub>S, y se purificaron en agar soya tripticaseína (AST) el cual se incubó a 37°C / 24h. Las colonias puras se pasaron en Agar Urea de Christensen y en Caldo Soya Tripticaseína (CST), ambas incubadas a 37°C / 24h. Las colonias que presentaron la prueba de Urea negativa se les realizó una caracterización por PCR como se menciona en el punto 8.4 .

Para el ensayo de co-ocurrencia además se emplearon los agares selectivos Hektoen (HK) y Verde Brillante (VB).

## **8.3.Extracción del material genético**

Los aislados obtenidos se desarrollaron en CST para extraer el material genético mediante un kit de extracción Quick-DNA miniprep (Zymo Research) de acuerdo con las condiciones del fabricante. Se midió la concentración en NanoDrop y se realizaron diluciones para obtener una concentración de ADN de 5 ng/μl.

## **8.4. Identificación de *Salmonella* spp. por PCR**

El ensayo de PCR se llevó a cabo con 0.085 μL de taq polimerasa (1.25 U/ μL) Dream taq (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), 0.34 μL de dNTPs (0.2 mmol), 1.7 μL de Buffer 10X, 0.68 μL de los iniciadores (10 mmol) y a cada reacción se agregaron 2 μL de ADN de la muestra. Se realizaron 2 PCR para la identificación de *Salmonella*. La primer reacción utilizando iniciadores dirigidos al gen *invA* y la segunda al gen *16S rRNA* específicos para

*Salmonella* (Liu *et al.* 2002; Søbørg *et al.* 2013). Las condiciones de la PCR se mencionan en la **Tabla 5**.

El producto de amplificación se corrió en una cámara de electroforesis utilizando TBE al 1% y un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

**Tabla 5.-** Iniciadores utilizados en la identificación de *Salmonella enterica*

Gen	Iniciadores	Tamaño (Pb)	Condiciones de la PCR	Referencia
<i>16s rRNA</i>	MINf 5'-ACGGTAACAGGAAGMAG-3' MINr 5'-TATTAACCACAACACCT-3'	402	94°C/3min-35 ciclos de 94°C por 30s, 53°C/30s y 72°C/30s. Extensión final de 72°C.	Søbørg <i>et al.</i> , 2013
<i>invA</i>	Fw 5'-CTGTTGAACAACCCATTTGT-3' Rv 5'-CGGATCTCATTAATCAACAAT-3'	480	94°C/3min-35 ciclos de 94°C por 30s, 57.4°C/30s y 72°C/30s. Extensión final de 72°C.	Liu <i>et al.</i> , 2002

Se tomaron 5µl del producto de amplificación y se adicionaron 3µl de marcador de peso molecular para cargar el gel. El primer pozo se cargó con la escalera (ladder) de 1 Kb (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) para determinar el tamaño del material genético. Las condiciones de corrimiento fueron 90V y 400mA durante 45 min.

El gel se visualizó en un Fotodocumentador (MiniBis Pro, EE. UU.) con luz UV a 360 nm. La presencia de ambas bandas indicó que el material genético pertenece a *Salmonella enterica*.

### 8.5. Análisis bioinformático para la determinación de serogrupos.

Se realizó un primer análisis para determinar el serogrupo de los aislamientos a través de iniciadores dirigidos a genes involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos de la membrana externa de *Salmonella*, los cuales son utilizados en la determinación del serogrupo. Los iniciadores utilizados para el análisis bioinformático se obtuvieron de una revisión bibliográfica extensa. El análisis bioinformático se realizó únicamente a los primers dirigidos a los serogrupos mayormente vinculados a carne de pollo cruda (serogrupo B, C1, C2, D y

E) de acuerdo con la National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) (Nyirabahizi et al., 2020).

Se realizó una PCR in silico (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) a los iniciadores. Se obtuvo una secuencia como referencia, la cual fue utilizada para el análisis de alineación de secuencias mediante la herramienta bioinformática BLSTn, utilizando la base de datos de genomas completos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para determinar la especificidad se consideró el número total de secuencias identificadas, el número de secuencias de *Salmonella* que correspondieron correctamente al serogrupo y el número de secuencias no específicas (otros serogrupos). Los iniciadores seleccionados fueron utilizados en una PCR múltiple (mPCR) para determinar el serogrupo de los aislamientos.

#### **8.6. Validación de la mPCR para la determinación de serogrupos.**

Los primers obtenidos del análisis bioinformático fueron sintetizados por “Integrated DNA Technologies”. Estos llegaron al laboratorio liofilizados, se reconstituyeron con agua libre de DNasa, tomando en cuenta su concentración (Ej. 28.3nmoles + 283µL H<sub>2</sub>O libre de DNasa) y se preparó un stock de trabajo diluyendo 1:10 (180µL de agua libre de DNasa más 20µL del iniciador). Los iniciadores fueron validados a través de un ensayo de gradiente de temperatura para identificar la mejor temperatura de alineación. Se evaluó un gradiente de 50°C a 60°C (Cardona-Castro *et al.*, 2009; Lavalett *et al.*, 2009; B. Liu *et al.*, 2011).

Para la validación de la mPCR, se utilizó el ADN de 20 cepas de referencia de *Salmonella*, de las cuales se tiene secuenciado su genoma completo (Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Querétaro). Estas cepas pertenecen a 12 serotipos diferentes y a los 5 serogrupos a evaluar (B, C1, C2, D y E). Las condiciones de la PCR fueron 94°C / 3min, 35 ciclos de 94°C / 50s, posteriormente el gradiente de temperatura de 50°C a 60°C por 50s, 72°C por 50s y una extensión final de 72°C / 10min. Los productos de amplificación se corrieron en una cámara de electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% teñido con

bromuro de etidio. Los productos de amplificación se identificaron con un transiluminador de luz UV (~260nm).

### **8.7. Análisis bioinformático para la identificación de la determinante genética asociada a serotipos de *S. enterica*.**

Se realizó un análisis bioinformático de distintos genes reportados previamente por su capacidad para identificar *Salmonella* o su uso en serotipificación molecular. Como referencia se utilizaron los genes *fliC*, *manB* y *atpD*, los cuales son comúnmente utilizados en serotipificación molecular por su poder discriminatorio entre serotipos de *S. enterica* (Franklin *et al.*, 2011; McQuiston *et al.*, 2004; C. Yoshida *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2016).

Las secuencias de estos genes se alinearon mediante la herramienta BLASTn, con la base de datos de genomas completos del NCBI. Se identificó el número de secuencias alineadas, un porcentaje de cobertura del 80 al 100%, número de serotipos y especificidad al género *Salmonella*. A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis con el programa bioinformático de agrupamiento de secuencias en clusters CD-HIT ([http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit\\_suite/](http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/)), utilizando un porcentaje de identidad del 100 %.

La capacidad discriminatoria entre serotipos de cada uno de los genes se evaluó tomando en cuenta el número de clusters específicos (mismo serotipo), el número de clusters con un serotipo mayoritario (80 %) y la diversidad total de serotipos identificados. La sumatoria de la proporción de estos valores, se tomó como un índice de la capacidad para discernir entre serotipos de *S. enterica*.

Las secuencias de los genes que mostraron mayor poder discriminatorio se alinearon en el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) para observar variaciones en las secuencias o polimorfismos de un único nucleótido (SNP's por sus siglas en inglés) asociados a serotipos. También en este proceso se evaluaron iniciadores previamente reportados, a través de la identificación de un mayor número de secuencias.

### **8.8. Validación de la PCR con los iniciadores propuestos para el gen *srfC*.**

Los iniciadores dirigidos al gen *srfC* fueron sintetizados por “Integrated DNA Technologies” y reconstituidos como se describe en el punto 8.6. La validación por gradiente de temperaturas se realizó con cepas de referencia de *Salmonella* bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, un gradiente de alineación de 56°C a 66°C por 30s, una extensión a 72°C por 30s y una extensión final de 72°C por 10 min. Se realizó una electroforesis a los productos de amplificación y se revelaron en un transiluminador como se describió anteriormente.

### **8.9. Validación del método de serotipificación molecular con el gen *srfC*.**

Se evaluaron iniciadores dirigidos al gen *srfC* como se reportó en el punto 8.7. Derivado de del análisis por CD-HIT, se obtuvieron secuencias representativas. Estas secuencias se utilizaron para la corroboración bioinformática del serotipo. Cada secuencia se alineó en BLASTn con la base de datos de nucleótidos no redundantes del NCBI. Para identificar el serotipo se tomaron en cuenta el valor máximo de score, porcentaje de cobertura e identidad.

Además, se realizó la corroboración del serotipo de 20 cepas de referencia mencionadas anteriormente en el punto 8.6. Se les realizó una PCR con los iniciadores dirigidos al gen *srfC* y el producto de amplificación se mandó a secuenciar a GENEWIZ EE. UU. Las secuencias fueron alineadas mediante BLASTn con la base de datos de nucleótidos no redundantes del NCBI. Para definir el serotipo, se tomaron en cuenta las especificaciones antes mencionadas.

### **8.10. Serotipificación Molecular**

El producto de amplificación del gen (*srfC*) se corrió en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio a 90 V por 45 min. y se reveló en un transiluminador con luz UV (~260 nm) para identificar el producto de amplificación. Los productos de amplificación se diluyeron 1:2 (10µL de agua sin nucleasas y 10µL del producto de amplificación) al igual que el primer forward (5µL por reacción)

El método de secuenciación empleado fue Sanger, el cual consiste en utilizar una de las cadenas del ADN proveniente de los productos de amplificación como plantilla para una polimerización usando dideoxinucleótido trifosfato (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 *et al.*, 1977). Estas reacciones se llevarán a cabo en un sistema Big Dye Terminator chemistry (versión 2.0) de Applied Biosystems usando un secuenciador capilar ABI 3730XL (Peters *et al.*, 2017).

Las secuencias obtenidas del proceso de secuenciación fueron evaluadas a través de la herramienta BLASTn utilizando la base de datos del NCBI. Para la identificación del serotipo se utilizó el valor del 100 % de cobertura respecto a la secuencia original, el mayor porcentaje de identidad y los valores de score más elevados de cada secuencia. Adicionalmente se compararon los serotipos identificados por el análisis bioinformático con la identificación del serogrupo previamente determinado por la mPCR.

### **8.11. Análisis estadísticos**

Los resultados de la prevalencia de *S. enterica* entre los años, las estaciones del año y los puntos de venta, fueron comparados a través de la prueba de Chi cuadrada (Ghafir *et al.*, 2005; Ni *et al.*, 2018) mediante el software XLSTAT. Los intervalos de confianza (95%) se calcularon mediante el procedimiento de Wilson descrito en la literatura previamente (L. Y. R. Wang *et al.*, 2018). Los Odds ratios (OR) y sus intervalos de confianza al 95% se calcularon utilizando el software MedCalc. El análisis del coeficiente de correlación de Pearson y ANOVA (Prueba de Tukey post hoc) se utilizaron para comparar los datos de temperatura, precipitación, producción de pollo y casos de salmonelosis a través de XLSTAT. Las diferencias significativas se consideraron a una  $p < 0.05$ . El análisis de odds ratio combinados (Factor sinérgico) se estimó de acuerdo a lo estipulado previamente en la literatura (Cortina-Borja *et al.*, 2009).

Para corroborar que la diferencia de número de muestras entre años no genera distintos resultados, se realizó un análisis utilizando un número comparable de muestras ( $n = 240$ ) por año. Se utilizó un subconjunto de muestras ( $n = 20$  por mes) que fueron seleccionadas para el año 2016, mediante la herramienta muestreo aleatorio del software XLSTAT. Los análisis estadísticos se realizaron como se describieron previamente.

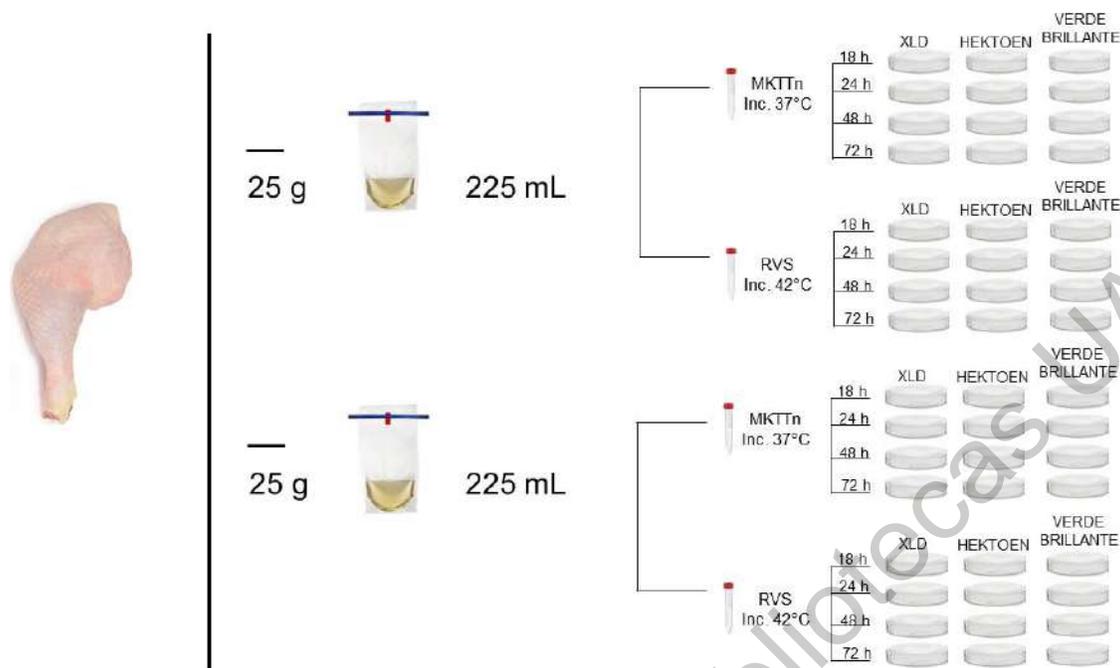
#### **8.12. Análisis de rarefacción.**

Se realizó un análisis de la diversidad de serotipos de *S. enterica* presentes en carne de pollo a través del re-muestreo temporal (2016 – 2018) de piezas de pollo obtenidas en mercados públicos y supermercados de Querétaro. Se obtuvo la prevalencia de cada serotipo por año de muestreo. Los resultados se acomodaron en un archivo txt para poder analizarlos mediante el software “EstimateS”, del cual se obtuvieron estimaciones no paramétricas sobre la diversidad de serotipos presente en carne de pollo.

#### **8.13. Evaluación de co-ocurrencia por un método cultivo-dependiente.**

Se analizaron 12 muestras de carne cruda de pollo con piel de la misma manera que se estipula en el punto **8.2**. Cada muestra se analizó por duplicado para aumentar la probabilidad de detección de *S. enterica*. El caldo Rappaport (Rp) y Tetracionato (TT) se incubaron por 18h, 24h, 48h y 72h. Por cada tiempo de incubación y caldo enriquecido se realizó un pase a XLD, agar Hektoen y agar Verde Brillante mediante una asada, este procedimiento se realizó 2 veces con la finalidad de aumentar la probabilidad de recuperación. Estas placas se incubaron a 37°C / 24h. A las colonias que desarrollaron una morfología colonial típica a *Salmonella* (**8.2**) y fueron negativas en la prueba bioquímica urea de Christensen, se les realizó una determinación por PCR para *Salmonella* como se determina en el punto **8.4**, se les realizó una mPCR para la determinación de serogrupo (**8.6**) y una serotipificación molecular como se describe en el punto **8.10**.

El diseño experimental de esta evaluación se muestra en la **Figura 3**.



**Figura 3.-** Determinación de co-ocurrencia de serotipos de *Salmonella* por un método cultivo-dependiente. Cada pieza de pollo de supermercado se trabajó por duplicado (N = 24). Los caldos de enriquecimiento Muller Kauffmann Tetrathionato con novobiocina (MKTTn) y Rappaport Vassiliadis Soya (RVS) se incubaron a 18h, 24h, 48h y 72h. Se realizó un pase por duplicado a los agares selectivos XLD, Hektoen y Verde Brillante de donde se obtuvieron las colonias morfológicamente típicas a *Salmonella* spp.

## 9. Resultados y discusión.

### 9.1. Análisis temporal de la prevalencia de *Salmonella* spp en cárnicos crudos.

Los resultados del punto 9.1. forman parte de esta tesis doctoral y fueron utilizados para la publicación de un artículo en la revista *Foods*: “Three-Year Longitudinal Study: Prevalence of *Salmonella* Enterica in Chicken Meat is Higher in Supermarkets Than Wet Markets from Mexico”, Iván D Regalado-Pineda<sup>1</sup>, Rene Rodarte-Medina<sup>1</sup>, Carolina N Resendiz-Nava<sup>1</sup>, Cinthia E Saenz-Garcia<sup>1</sup>, Pilar Castañeda-Serrano<sup>2</sup>, Gerardo M Nava<sup>1</sup> - doi: 10.3390/foods9030264. Sólo los resultados de este capítulo son la traducción literal del artículo mencionado.

La prevalencia general de *Salmonella* en 1,160 muestras de carne de pollo cruda fue de 18.1% (210/1160). Ésta, incrementó respecto al tiempo ( $P > 0.001$ ) siendo en 2016 de 13.7% y para el 2018 de 27.1% (**Tabla 6**). Una contaminación similar con este patógeno (21.3%) ha sido reportado previamente en distintos puntos de venta del norte, centro y sur de México

(Miranda *et al.*, 2009; Zaidi *et al.*, 2008). Esta prevalencia en carne de pollo también se ha observado en otras partes del mundo como Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, China, Colombia, Ecuador, Portugal, España, Estados Unidos, Venezuela y Gales, donde la prevalencia va de 9.5% a 65% (Fearnley *et al.*, 2011; Giombelli & Gloria, 2014; Vinueza-Burgos *et al.*, 2016; Y. Wang *et al.*, 2014). Estos datos indican que la carne de pollo distribuida en este tipo de expendios puede representar un factor de riesgo importante en casos de salmonelosis en humanos.

Pocos estudios se han realizado en periodos largos de tiempo para determinar el impacto de la presencia de *S. enterica* a través del tiempo (Harrison *et al.*, 2001; Minami *et al.*, 2010; Shafini *et al.*, 2017; Y. Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Estos estudios longitudinales permiten robustecer los análisis estadísticos (Caruana *et al.*, 2015) y poder evidenciar patrones temporales sobre la prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo.

En los tres años de estudio, la prevalencia mensual de *Salmonella* osciló entre 8.7% y 30%, y entre las estaciones del año fue de 15.1% a 20.9%. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ; odds ratio  $>1.5$ , 95% CI: 1.0–2.3) entre los meses o las estaciones del año (**Tabla 6**).

**Tabla 6.-** Prevalencia de *Salmonella* a través del tiempo

	No. de muestras	Prevalencia (%)	95% CI
<b>General</b>			
2016 - 2018	1,160	18.1	15.9 - 20.5
<b>Anual</b>			
2016	680	13.7	11.2 - 16.6
2017	240	21.7	16.7 - 27.5
2018	240	27.1	21.7 - 33.3
<b>Estacional</b>			
Primavera	312	15.1	11.4 - 19.6
Verano	312	17.9	14.0 - 22.8
Otoño	268	19.0	14.6 - 24.4
Invierno	268	20.9	16.3 - 26.4
<b>Mensual</b>			
Enero	104	20.2	13.2 - 29.4
Febrero	104	19.2	12.4 - 28.4
Marzo	104	8.7	4.3 - 16.2
Abril	104	22.1	14.8 - 31.5
Mayo	104	14.4	8.6 - 23.0
Junio	104	17.3	10.9 - 26.3
Julio	104	21.2	14.0 - 30.5
Agosto	104	15.4	9.3 - 24.1
Septiembre	104	12.5	7.1 - 20.8
Octubre	104	19.2	12.4 - 28.4
Noviembre	60	30.0	19.2 - 43.4
Diciembre	60	25.0	15.1 - 38.1

Un resultado interesante a resaltar es que el análisis sobre la prevalencia estacional de *Salmonella* realizado por año mostró que sí existe una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en el invierno del 2016 (20.3%) en comparación con las otras estaciones del mismo año. Esta tendencia no se observó en los otros años de estudio (**Tabla 7**). Esto podría deberse a que existen otros factores que tienen un mayor impacto en la prevalencia de este patógeno en comparación con el factor estacional. Para corroborar esta idea, se realizó una comparación

con otros factores como la precipitación pluvial, temperatura y la producción de carne de pollo en la región de Querétaro. No hubo una correlación estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre la precipitación, temperatura o producción de carne de pollo con la prevalencia de *Salmonella*. En un estudio longitudinal sobre la prevalencia de *Salmonella*, se observó que el factor estacional en la prevalencia depende del año de estudio (Sivaramalingam *et al.*, 2013). Otros estudios muestran discordancia en la prevalencia estacional de *S. enterica* (Huang *et al.*, 2016; Minami *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2018; Y. Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Estos resultados muestran la importancia de realizar estudios temporales sobre la prevalencia de *S. enterica* para identificar patrones estacionales por año de estudio.

**Tabla 7.-** Efecto estacional sobre la prevalencia de *Salmonella*.

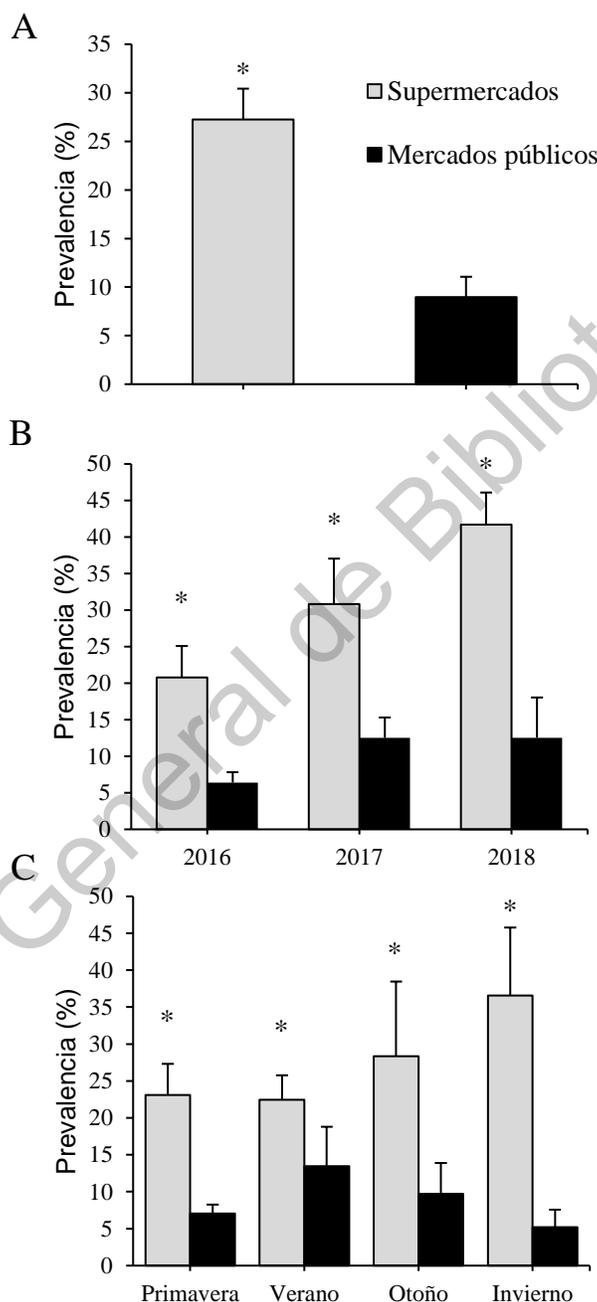
Estación del año	2016	2017	2018
Primavera	24/192 (12.5) <sup>b</sup>	10/60 (16.7) <sup>a</sup>	13/60 (21.7) <sup>a</sup>
Verano	25/192 (13.0) <sup>b</sup>	15/60 (25.0) <sup>a</sup>	16/60 (26.7) <sup>a</sup>
Otoño	14/148 (9.4) <sup>b</sup>	18/60 (30.0) <sup>a</sup>	19/60 (31.7) <sup>a</sup>
Invierno	30/148 (20.3) <sup>a</sup>	9/60 (15.0) <sup>a</sup>	17/60 (28.3) <sup>a</sup>

(Prueba de Chi-cuadrada;  $P < 0.05$ )

Después de 3 años de análisis microbiológicos en carne de pollo expedida en mercados y supermercados de Querétaro, la prevalencia de *S. enterica* mostró ser mayor ( $P < 0.0001$ ) en supermercados (27.2%, 158 / 580) que en mercados públicos (9.0%, 52/580) (**Figura 4A**). Esta prevalencia se mantuvo en cada año de estudio, obteniendo para supermercados una prevalencia de 20.8%, 30.8%, y 41.7%, en comparación con las obtenidas en mercados públicos (6.4%, 12.5%, y 12.5%) (**Figura 4B**). Es 3.8 veces más probable (Odds ratio = 3.8,  $P < 0.0001$ ) recuperar *Salmonella* en pollos expedidos en supermercados en comparación con los vendidos en mercados públicos (**Tabla 8**). En la mayoría de los meses analizados (9/12), fue de 3.7 a 29.4 más probable ( $P < 0.019$ ) recuperar *S. enterica* en supermercados en comparación con mercados públicos, y fue al menos, 3.1 veces más probable recuperar *S. enterica* en supermercados en un análisis anual (**Tabla 8**).

El análisis sobre la prevalencia estacional entre los sitios de muestreo reveló diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en todas las estaciones del año (Primavera, verano, otoño e invierno)

en supermercados; oscilando entre 23.1% y 36.6%, en comparación con los mercados públicos (7.1% a 13.5%) (**Figura 4C**), siendo hasta 10.5 veces más probable ( $P < 0.05$ ) encontrar pollo con *Salmonella* en supermercados (**Tabla 8**).



**Figura 4.-** Prevalencia de *Salmonella* por sitio de muestreo (A), año (B) y estación (C). Los asteriscos muestran diferencia estadística entre supermercados y mercados públicos (Prueba de Chi-cuadrada;  $P < 0.05$ ).

Es interesante resaltar que el análisis de factores combinados mostró un elevado riesgo (Odds ratio combinados = 2.8, 95% CI: 4.5–24.2, p = 0.028) de contaminación del pollo en supermercados cuando éste se vende en invierno (**Tabla 9**).

**Tabla 8.-** Análisis Odds ratio de la prevalencia de *Salmonella* en supermercados a través del tiempo.

	Odds ratio	95 % intervalos de confianza	P value
<b>General</b>			
2016 to 2018	3.8	2.7 - 5.3	<b>P &lt; 0.0001</b>
<b>Mensual</b>			
Ene.	4.2	1.4 - 12.5	<b>P = 0.0104</b>
Feb.	29.4	3.8 - 229.9	<b>P = 0.0013</b>
Mar.	3.9	0.8 - 19.7	P = 0.1008
Abr.	3.7	1.3 - 10.4	<b>P = 0.0123</b>
May	4.9	1.3 - 18.6	<b>P = 0.0194</b>
Jun	11.1	2.4 - 51.4	<b>P = 0.0021</b>
Jul	1.6	0.6 - 4.1	P = 0.3390
Ago.	0.5	0.2 - 1.6	P = 0.2815
Sept.	0.8	0.3 - 2.7	P = 0.7670
Oct.	7.9	2.2 - 29.2	<b>P = 0.0018</b>
Nov.	9.0	2.2 - 36.2	<b>P = 0.0020</b>
Dic.	25.4	3.1 - 211.1	<b>P = 0.0028</b>
<b>Estacional</b>			
Spring	2.4	1.2 - 4.9	<b>P = 0.0189</b>
Summer	1.9	1.0 - 3.4	<b>P = 0.0407</b>
Autumn	3.7	1.9 - 7.3	<b>P = 0.0002</b>
Winter	10.5	4.5 - 24.2	<b>P &lt; 0.0001</b>
<b>Anual</b>			
2016	3.8	2.3 - 6.3	<b>P &lt; 0.0001</b>
2017	3.1	1.6 - 6.1	<b>P = 0.0008</b>
2018	5.0	2.6 - 9.6	<b>P &lt; 0.0001</b>

Referencia: Mercado público (odds ratio = 1).

Para corroborar que los resultados obtenidos no fueron influenciados por el número de muestras por año, se realizó un re-muestreo aleatorio con 240 muestras por año y se repitieron los análisis. No hubo diferencias significativas (Tablas y figuras en Anexos).

**Tabla 9.-** Análisis Odds ratio de factores combinados sobre la prevalencia de *Salmonella*.

	Odds Ratio Combinados a,*	Intervalo de Confianza 95 %	Valor de p
Supermercado*Primavera	1.0	0.47–2.29	p = 0.922
Supermercado*Verano	0.5	0.25–0.97	p = 0.040
Supermercado*Otoño	1.0	0.45–2.08	p = 0.940
Supermercado*Invierno	2.8	4.5–24.2	p = 0.028
Anual			
Supermercado*2016	1.0	0.55–1.83	p = 0.990
Supermercado*2017	0.8	0.38–1.73	p = 0.604
Supermercado*2018	1.3	0.63–2.74	p = 0.464

<sup>a</sup> Odds ratio combinado (Factor sinérgico) estimación descrita por (Cortina-Borja *et al.*, 2009). \* Referencia: Mercado público (odds ratio = 1).

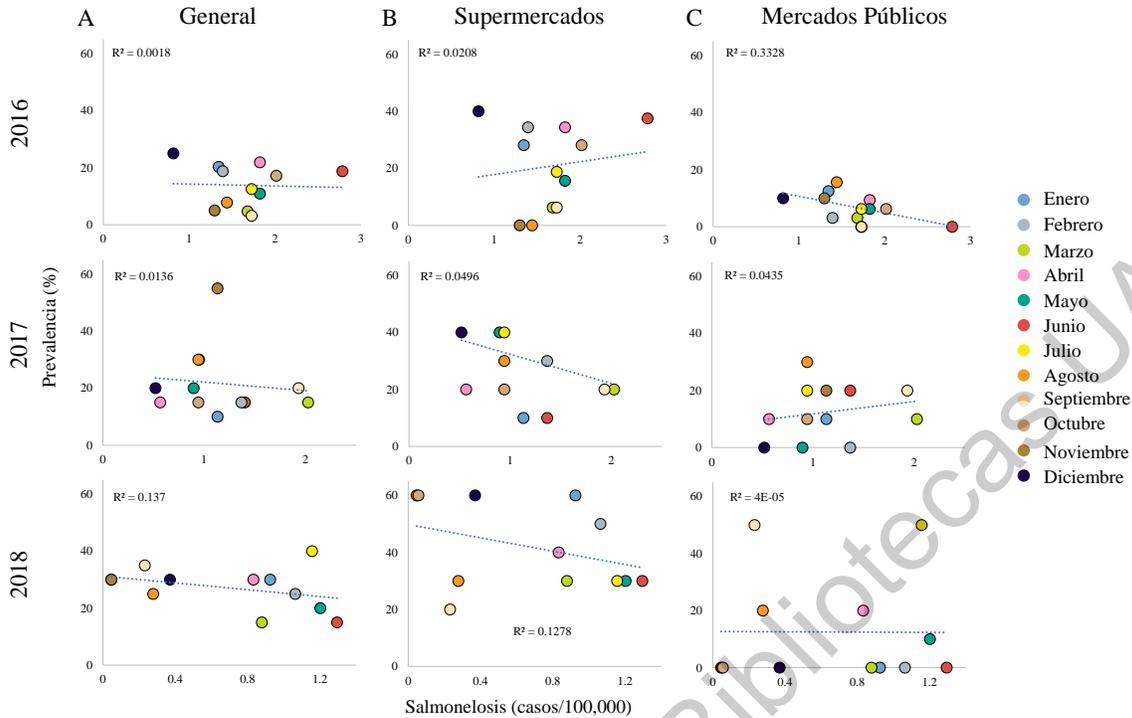
Existe un problema importante de contaminación por *Salmonella* en el pollo expedido en supermercados. Este fenómeno no es anual dependiente, por el contrario, muestra una tendencia a incrementar con los años (aumento de prevalencia de 29.9%, ( $P < 0.0001$ )). Éste no es un resultado esperado, puesto que en este tipo de puntos de venta se esperarían mejores condiciones sanitarias de trabajo, así como la implementación de procesos de calidad para prevenir este escenario (Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2014).

Sin embargo, otros reportes en el continente Europeo y Asiático han mostrado una mayor o comparable contaminación de *Salmonella* en supermercados en comparación con mercados públicos (Capita *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2016; Minami *et al.*, 2010; Shafini *et al.*, 2017; Y. Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Por ejemplo, en España y Rusia, se ha observado una mayor prevalencia ( $P < 0.05$ ) de *Salmonella* en supermercados (75.0% y 60%, respectivamente) en comparación con los mercados públicos (25.0% y 7.7%, respectivamente). Por otra parte, en otros estudios de distintas partes del mundo, no se ha reportado una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en los niveles de contaminación por *Salmonella* entre estos dos tipos de mercados (Harrison *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2016; Minami *et al.*, 2010; Shafini *et al.*, 2017). La elevada prevalencia de *Salmonella* en supermercados puede deberse a la extendida vida de anaquel (~6 días) que se maneja en este

tipo de expendios (Alali *et al.*, 2012), comparado con las 16h en las que aproximadamente está expuesta la carne de pollo en los mercados públicos (Capita *et al.*, 2003). Tomando en cuenta los resultados del presente estudio, muestran la necesidad urgente para que tanto productores y supermercados identifiquen la causa de este importante riesgo en la salud de las personas.

Para determinar el riesgo de contraer salmonelosis por un pollo contaminado en México, se realizó un análisis de regresión utilizando la prevalencia mensual de *Salmonella* y los casos mensuales de salmonelosis reportados en Querétaro para los años en los que se llevó a cabo el presente estudio (2016 – 2018). Estos datos se obtuvieron del Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud (Salud, 2020). De acuerdo con estos datos, los casos de salmonelosis en México fueron mayores ( $P > 0.05$ ) en 2016 (Promedio = 1,6 casos por 100,000 personas), seguidos de 2017 (1.1 casos por 100,000 personas) y 2018 (0.6 casos por 100,000 personas).

Es interesante notar que no existe una relación estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ,  $R^2 < 0.13$ ) entre la prevalencia general de *Salmonella* reportada en el presente estudio y los casos de salmonelosis reportados para el periodo del 2016 a 2018 (**Figura 5A**). Los mismos resultados ( $P > 0.05$ ,  $R^2 < 0.33$ ) fueron observados utilizando las prevalencias de supermercados o mercados públicos (**Figura 5 B, C**). Otros estudios han reportado la ausencia de correlación entre los casos de salmonelosis en humanos y la prevalencia de *Salmonella* en carne de pollo (Fearnley *et al.*, 2011; Sivaramalingam *et al.*, 2013). Sin embargo, pudieran no existir datos suficientes en México como para deslindar la relación entre la prevalencia en pollo y los casos de salmonelosis. La intoxicación alimentaria por *Salmonella* involucra rasgos biológicos – ecológicos complejos, en donde los datos de prevalencia pueden no ser suficientes para establecer correlaciones epidemiológicas (Cox *et al.*, 2011).



**Figura 5.-** Correlación entre la prevalencia de *Salmonella* en carne de pollo y casos de salmonelosis. El análisis se realizó utilizando los datos de prevalencia en carne de pollo versus el número de casos de salmonelosis en general (A), con los datos de prevalencia de supermercados (B) y mercados públicos (C).

## 9.2. Multiplex PCR para la determinación de serogrupos

Se identificaron iniciadores previamente reportados en la literatura para determinar serogrupos. Únicamente se tomaron en consideración los iniciadores dirigidos a los serogrupos B, C1, C2, D y E, los cuales forman parte de los serotipos más prevalentes en carne de pollo de acuerdo a lo estipulado por la NARMS (Nyirabahizi *et al.*, 2020).

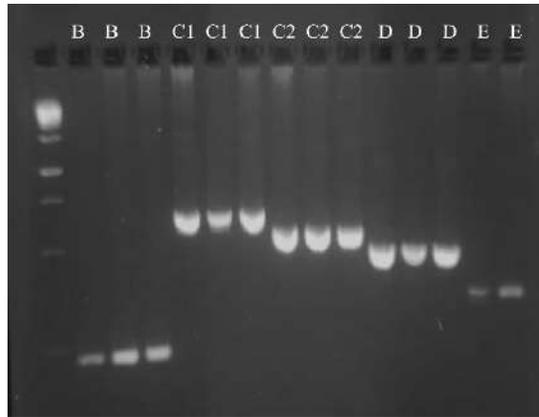
Se identificaron 25 iniciadores, de los cuales, se descartaron 16 por no mostrar especificidad (98% - 100 %) para el género *Salmonella* mediante la alineación de secuencias en BLASTn con la base de datos de nucleótidos no redundantes del NCBI. Los 9 pares de iniciadores restantes fueron evaluados de acuerdo con su especificidad por alinearse a secuencias correspondientes a su serogrupo. Se tomó en consideración el número de secuencias alineadas, el número de serotipos identificados pertenecientes al serogrupo evaluado y el número de secuencias discordantes que pertenecen a otro serogrupo (**Tabla 10**). También se

tomó en cuenta el tamaño del amplicón para evitar que bandas de un tamaño similar se confundan a la hora de ser reveladas.

**Tabla 10.-** Iniciadores utilizados en la identificación de serogrupos de *S. enterica*.

Serogrupo	Iniciadores	Tamaño (Pb)	Aciertos - otro serogrupo	Referencia
wzx-B	F-wzxB GGCATATATTTCTGTATTCGCG-3' y R-wzxB GCCTTAATTAAGTAAGTTAGTGGAAGC-3'	230	130-3	Herrera-León <i>et al.</i> , 2007
B	SB-L CGATGAGGGTTTCTAATCTC - SB-R TCTTGCTTCAGTATCCCTTG	177	92-1	Liu <i>et al.</i> , 2011
C1	SC1-L CAGTCACAACCTGGAAGA - SC1-R ATACAAGCCGCTGAGTGA	623	71-4	Liu <i>et al.</i> , 2011
C2	SC2-L CAGTAGAGACGACGGAGTTC - SC2-R TACATGCTTGGCTGAGACTA	540	37-1	Liu <i>et al.</i> , 2011
C2	F-AATAGGCCGAAACAACATCG - R- CCGAGCCAACGATTATCAA	502	40-1	Cardona-Castro <i>et al.</i> , 2009
tyv-D	F-tyvD GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT-3' R-tyvD 5'- TAGCAAACCTGTCTCCCACCATAC-3'	615	396-3	Hirose <i>et al.</i> , 2002; Herrera-León <i>et al.</i> , 2007
D	SD -L GCCAATAAACTCCACAACAT - SD -R GGATCATGCGTTAAATGTCT	466	401-8	Liu <i>et al.</i> , 2011
E	E-F CTAATGATTTGCGGCGTCTC - E-R CAGTGGGGAAGCTATTGCTGAT	348	43-1	Lavalett <i>et al.</i> , 2009
wzx-E	F-wzxE1 TAAAGTATATGGTGCTGATTTAACC-3' y R- wzxE1 GTTAAAATGACAGATTGAGCAGAG- 3'	345	41-0	Herrera-León <i>et al.</i> , 2007

Tomando en cuenta estas consideraciones se eligieron para la mPCR los iniciadores wzx-B, SC1, SC2, SD y E. Para la validación de la mPCR se realizó un gradiente de temperaturas para identificar la temperatura de alineación óptima, la cual fue de 56.9°C. Se realizó la mPCR utilizando cepas de referencia con el siguiente protocolo: 94°C / 3min, 35 ciclos de 94°C / 50s, 56.9°C por 50s, 72°C por 50s y una extensión final de 72°C / 10min. Los productos de amplificación se identificaron en un transiluminador (**Figura 6**).



**Figura 6.-** Imagen de los productos de amplificación de la mPCR para determinar serogrupos. En la primera línea está el DNA Ladder de 1kb, seguido de 3 amplicones del serogrupo B (serotipos Agona, Derby y Agona), 3 amplicones del serogrupo C1 (Infantis, Rissen y Braenderup), 3 amplicones del serogrupo C2 (Newport, Manhattan y Kentucky) y 2 amplicones del serogrupo E (Anatum y Give).

### 9.3. Análisis bioinformático – Determinante genética para diferenciar serotipos.

Existen distintas determinantes genéticas reportadas por su capacidad para tipificar aislamientos de *Salmonella* y sus serotipos (Braun *et al.*, 2012; Fresno *et al.*, 2014a; C. E. Yoshida *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta ahora no existe una única determinante genética específica para *Salmonella* con la capacidad para diferenciar entre serotipos que pueda ser utilizada en la genoserotipificación de este patógeno. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo la identificación de esta determinante genética.

Se identificaron 45 genes en la literatura como prospectos. Para esta selección se tomaron en cuenta que fueran previamente reportados como genes específicos para la identificación de *S. enterica* o por ser utilizados en algún método molecular para la genoserotipificación de este patógeno. A través de la alineación de sus secuencias en BLASTn con la base de datos de nucleótidos no redundantes del NCBI, se descartaron 21 genes, al identificar el análisis de alineación de secuencias >20% de secuencias de otros géneros bacterianos.

Para identificar el número total de serotipos de *S. enterica* presente en la base de datos de genomas completos del NCBI, se utilizaron los genes constitutivos *invA* y *fliC*. Secuencias

representativas de estos genes fueron utilizadas en un análisis de alineación de secuencias mediante BLASTn con la base de datos de RefSeq Genome Database del NCBI. Se identificaron 179 serotipos distintos. Este valor sirvió de referencia en la evaluación de los genes prospectos. Los genes que lograron identificar una mayor diversidad de serotipos mediante el análisis de sus secuencias fueron 7 (**Tabla 11**). El resto de los genes se clasificaron como no constitutivos del género de *Salmonella* al estar presentes en un número limitado de secuencias (80 – 900) o identificar un número reducido de serotipos (8 – 55).

Se realizó un análisis de agrupamiento de secuencias con base en su porcentaje de identidad (100 %) utilizando CD-HIT. Se obtuvieron un número distinto de clusters dependiendo del gen evaluado. Posteriormente se calculó a cada gen el índice discriminatorio (**Tabla 11**) como se mencionó previamente en el punto 8.7 de metodología. Para contrastar el valor poder discriminatorio de cada gen, se comparó el valor del índice discriminatorio con el obtenido por los genes *fliC*, *manB* y *atpD*, reportados previamente en la literatura por su capacidad para discernir entre serotipos (Christensen & Olsen, 1998; Y. Liu *et al.*, 2017; Sukhnanand *et al.*, 2005).

**Tabla 11.-** Genes evaluados por su poder discriminatorio entre serotipos. El total representa la sumatoria de la proporción de los otros indicadores.

Gen	Clusters específicos 100%	Clusters con serotipo mayoritario	Diversidad de serotipos	Total
<i>manB</i>	13.86	94.88	82.48	191.22
<i>yhgE</i>	13.40	90.91	74.13	178.43
<i>srfC</i>	12.26	90.57	74.83	177.66
<i>sipB</i>	18.40	95.71	61.54	175.65
<i>fliC</i>	8.91	81.51	73.18	163.60
<i>srfC*</i>	13.17	83.23	56.43	152.84
<i>fimA</i>	14.38	79.45	46.15	139.99
<i>pdgL</i>	15.91	80.30	42.66	138.87
<i>atpD</i>	5.26	74.34	45.89	125.50
<i>sipC</i>	6.58	73.68	44.76	125.02
<i>stn</i>	12.36	75.28	29.37	117.01

*srfC\** Iniciadores reportados por Liu *et al.*, 2012.

A pesar de que el gen *yhgE* mostró una especificidad al género *Salmonella*, las secuencias evaluadas con los iniciadores reportados en la literatura, mostraron no ser específicos, por

lo que se descartaron del análisis. El siguiente gen que mostró un valor de índice discriminatorio más elevado fue el *srfC* (177.66). El análisis realizado con los iniciadores dirigidos a este gen (Liu *et al.*, 2012) mostraron una disminución en el poder discriminatorio (152.84), sin embargo, está sólo por debajo del gen *fliC*, el cual ha sido ampliamente utilizado en los métodos de serotipificación molecular por su alto poder discriminatorio (Franklin *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2017; C. Yoshida *et al.*, 2014; C. E. Yoshida *et al.*, 2016).

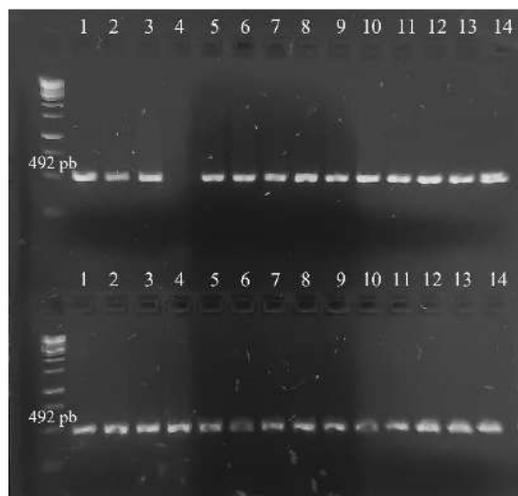
El gen *srfC* de aproximadamente 2150 pb de tamaño codifica para un factor de virulencia de *Salmonella*. Se encuentra ampliamente distribuido en este género al estar presente en más de las 5000 secuencias de genomas completos de la base de datos del NCBI y 143 de los 179 serotipos identificados en esta base de datos. Los iniciadores reportados por Liu y colaboradores amplifican un fragmento de 492 pb del gen. Derivado del análisis de alineación de secuencias

se observaron secuencias no identificadas por los iniciadores, por lo que se realizó variaciones de los iniciadores con nucleótidos redundantes para ampliar el número de secuencias identificadas. Los iniciadores quedaron de la siguiente manera: *srfC*-fw-5'GGCGTTAACCCACTCCAGTA 3' y *srfC*-rv-5' TTA CTGTGGGAGAGCARCC 3'.

Para la validación bioinformática de esta determinante genética se utilizó la base de datos de genomas completos del NCBI y se extrajeron las secuencias de *srfC* empleando los iniciadores previamente mencionados para confirmar su serotipo. De los 125 serotipos distintos que conformaron estas secuencias, el 10.42% fueron difíciles de identificar al presentar una única secuencia perteneciente a ese serotipo. Al igual que en otras determinantes genéticas, los criterios para la identificación del serotipo fueron el valor máximo de score, el mayor porcentaje de cobertura de la secuencia original y el mayor porcentaje de identidad (Fresno *et al.*, 2014b). Se logró identificar el 100% de serotipos en este proceso de validación.

Este mismo proceso se llevó a cabo con cepas de referencia de *Salmonella*, de las cuales, se tiene secuenciado su genoma completo. La temperatura óptima de alineación de los

iniciadores *srfC* fue de 66°C. Se realizó la PCR para la obtención de los amplicones (**Figura 7**) y su posterior secuenciación.



Gel superior		Gel inferior	
Posición	Serotipo	Posición	Serotipo
1	<i>Salmonella</i> spp.	1	Give
2	<i>Salmonella</i> spp.	2	Muenster
3	<i>Salmonella</i> spp.	3	Agona
4	<i>E. coli</i>	4	Derby
5	Agona	5	Agona
6	Derby	6	Infantis
7	Agona	7	Rissen
8	Infantis	8	Braenderup
9	Rissen	9	Newport
10	Braenderup	10	Manhattan
11	Newport	11	Kentucky
12	Manhattan	12	Anatum
13	Kentucky	13	Give
14	Anatum	14	Muenster

**Figura 7.-** PCR con los iniciadores dirigidos al gen *srfC* (492pb). Validación con cepas de referencia de *Salmonella*.

El 80% (16/20) de las secuencias se identificaron correctamente. El 20% (4/20) restante, se dificultó su identificación, debido a que dentro de las secuencias con mayor porcentaje de score, cobertura e identidad se encontraban secuencias de 2 o más serotipos distintos (**Tabla 12**). Sin embargo, al realizarles la mPCR para determinar su serogrupo, este sirvió para poder distinguir el serotipo correspondiente. Finalmente se logró, de esta manera, identificar el 100% de las secuencias como concordantes con los serotipos de las cepas de referencia.

**Tabla 12.-** Identificación de serotipos a través de la secuenciación de la determinante genética *srfC*. Estos serotipos pertenecen al 20% de las cepas de referencia de *Salmonella* que se les considera difíciles de identificar, debido a que presentan 2 o más serotipos con el mismo porcentaje de identidad. En fondo gris la identificación correcta.

Serotipos identificados				Porcentaje de identidad	No. De secuencias identificadas		
Serogrupo	O:54	B	E	99.78%	24	7	6
Serotipo	Montevideo	Schwarzengrund	Muenster				
Serogrupo	C1	C2		99.70%	30	5	
Serotipo	Bareilly	Muenchen					
Serogrupo	O:54	B	E	100%	28	8	1
Serotipo	Montevideo	Schwarzengrund	Give				
Serogrupo	C1	C2		99.77%	28	1	
Serotipo	Bareilly	Manhattan					

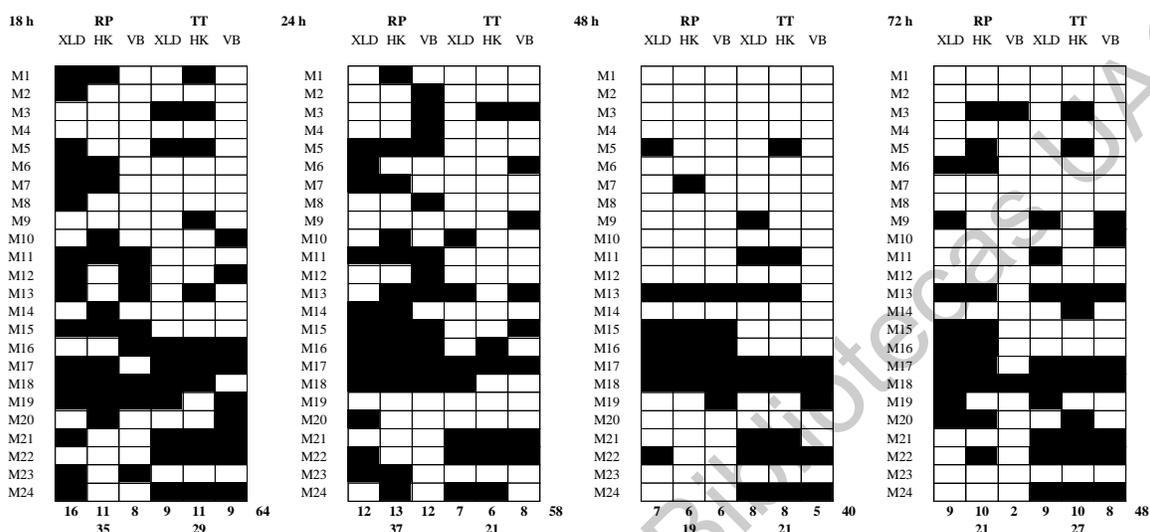
Existen algunos serotipos de *Salmonella* que comparten identidad genética y son difíciles de diferenciar a través del análisis de sus secuencias (Thompson *et al.*, 2018) y se les considera serotipos polifiléticos (Sukhnand *et al.*, 2005; Timme *et al.*, 2013).

#### 9.4. Co-ocurrencia de *S. enterica*.

Se identificó la presencia de *S. enterica* en las 12 muestras de carne de pollo de supermercados (Prevalencia del 100%). Esta prevalencia se debió al esfuerzo de muestreo realizado para la recuperación de este patógeno, al identificar su presencia en alguna de las muestras evaluadas (muestra o duplicado) o en alguna de las temperaturas de incubación de los caldos de enriquecimiento (RP y TT). Se obtuvieron en total 300 aislamientos, de los cuales 210 fueron tipificados como *Salmonella* (**Figura 8**).

Se identificaron 4 serogrupos, de los cuales C1 fue el más prevalente con el 47.14% (99/210), seguido del serogrupo D con el 25.4% (53/210), serogrupo E con el 2.38% (5/210) y el serogrupo B 1.43% (3/210). A pesar de que los 50 aislamientos restantes fueron identificados como *Salmonella*, no se logró identificar correctamente el serogrupo. Esto podría deberse a que estos aislamientos pertenecen un serogrupo distinto al que es posible detectar por la mPCR implementada en el presente trabajo, o a que a pesar de pertenecer a alguno de los

serogrupos que identifica esta prueba, los iniciadores dirigidos a estos serogrupos no son capaces de alinearse a las secuencias de estos aislamientos y por tanto se genera amplificación.

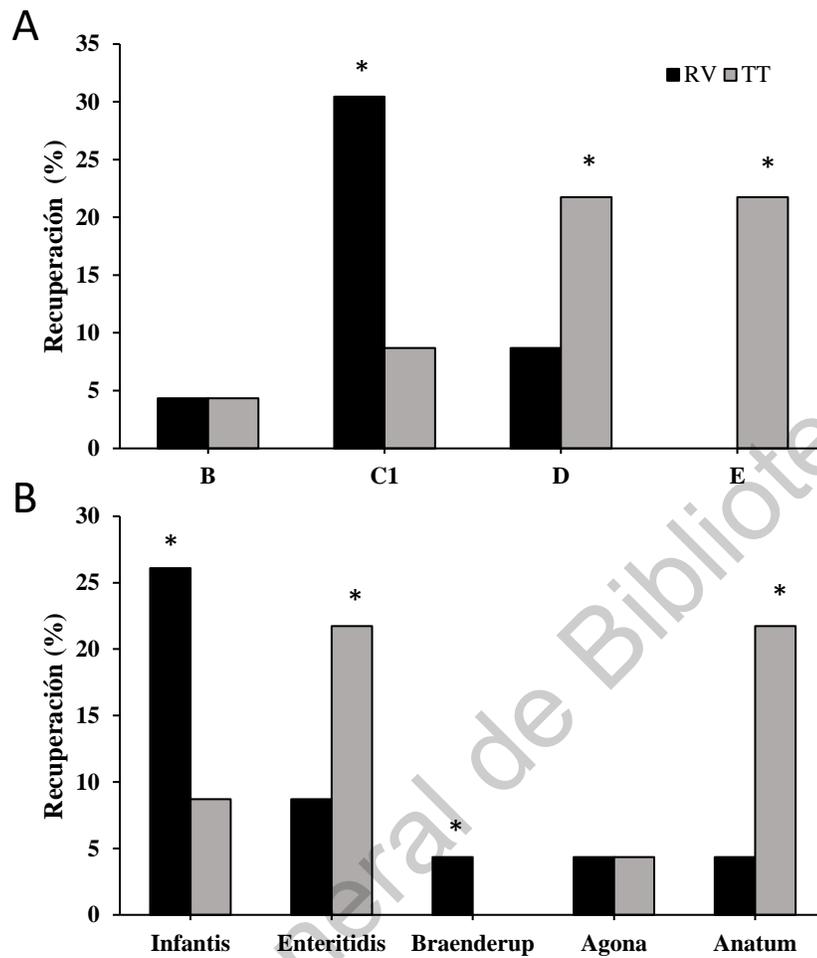


**Figura 8.-** Evaluación de 12 muestras de carne de pollo (Pierna y muslo con piel) expedidas en supermercados, a través de una variación del método convencional para el aislamiento de *Salmonella* (ISO 6579). Cada muestra se evaluó por duplicado (N=24). Los caldos de enriquecimiento Rappaport (RP) y Tetrionato (TT) se incubaron a 18h, 24h, 48h y 72h. Los cuadros con fondo negro indican la presencia de *S. enterica*. En la parte inferior de cada el número de muestras positivas por agar selectivo utilizado (XLD, Hektoen (HK) y Verde Brillante (VB)), debajo de éstos, las sumatorias de casos positivos por caldo de enriquecimiento.

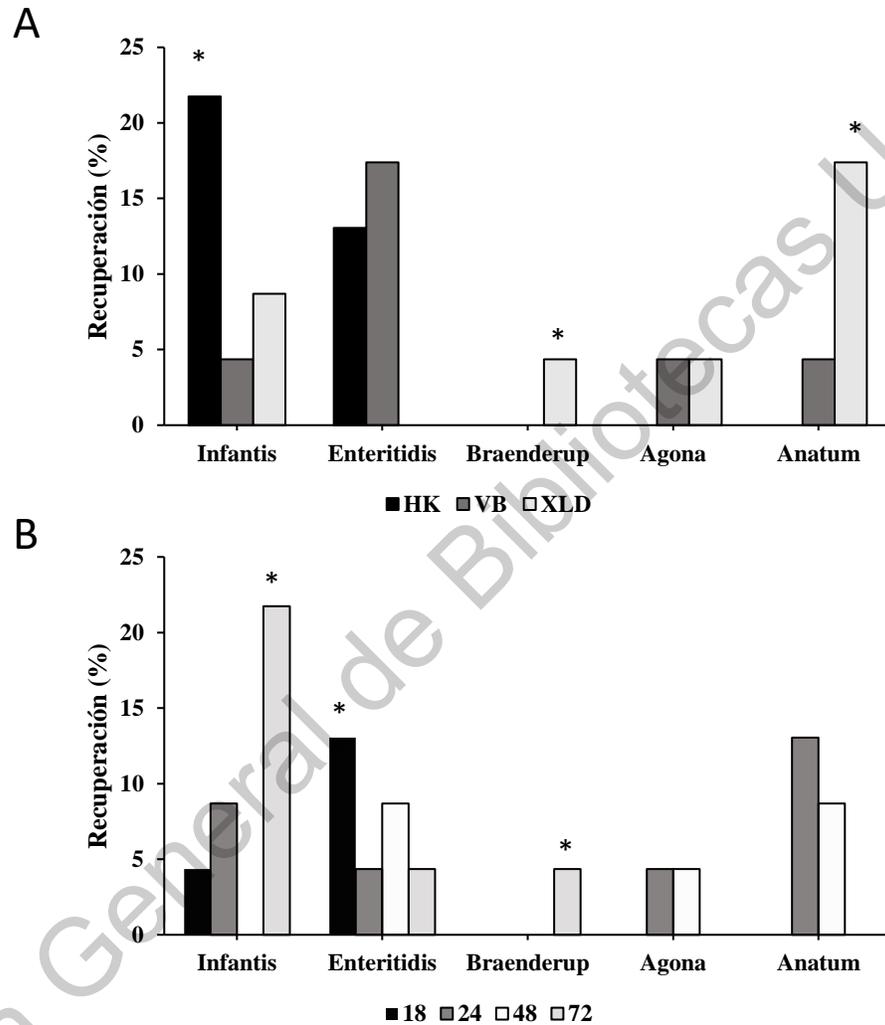
Se observó un aislamiento preferencial de serogrupos dependiendo del caldo de enriquecimiento. El serogrupo C1 se recuperó mayormente en caldo Rappaport ( $P < 0.0001$ ), mientras que los serogrupos D y E en caldo Tetrionato ( $P < 0.0001$ ) (A). Este mismo fenómeno se observó en los serotipos.

Se identificaron 5 serotipos distintos en 23 aislamientos seleccionados para su serotipificación. Esta selección se realizó con base en el análisis previo de serogrupos, con la finalidad de identificar la diversidad de serotipos presentes en estas muestras. Fueron Infantis ((26%)6/23) y Braenderup ((4)1/23) los serotipos que se aislaron mayormente de Rappaport ( $P < 0.05$ ) y los serotipos Enteritidis ((22%)5/23) y Anatum ((22%)5/23) de Tetrionato ( $P < 0.001$ ) (B). El otro serotipo identificado fue Agona, el cual se logró aislar tanto del caldo Tetrionato como de Rappaport ( $P = 0.428$ ).

El aislamiento preferencial también se observó dependiendo del agar selectivo o temperatura de incubación empleados. Brandenrup ((4%)1/23) y Anatum ((17%)4/23) se recuperaron con mayor frecuencia del agar XLD ( $P < 0.05$ ), mientras que Infantis ((22%)5/23) fue más frecuente en Hektoen ( $P = 0.016$ ) (**Figura 10A**). A 72h de incubación de los caldos de enriquecimiento, los serotipos Infantis ((22%)5/23) y Braenderup ((4%)1/23) fueron los que obtuvieron los mayores porcentajes de recuperación ( $P < 0.05$ ), mientras que a 18h de incubación, *S. Enteritidis* fue mayormente recuperado en comparación con 24h y 72h ((13%)3/23) (**Figura 10B**).



**Figura 9.-** Aislamiento preferencial de serogrupos (A) y serotipos (B) por tipo de caldo de enriquecimiento utilizado para su aislamiento (Rappaport (RV) o Tetratonato (TT). Asterisco representa significancia ( $P < 0.05$ ).



**Figura 10.-** Aislamiento preferencial de serotipos de *Salmonella* por agar selectivo (XLD, Hektoen o Verde Brillante) empleado (A) y horas de incubación de los caldos de enriquecimiento Rv y TT (B). Asterisco representa diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

El sesgo en la obtención de serotipos dependiendo de las condiciones del aislamiento ha sido previamente reportado (Davies *et al.*, 2000; Kafel & Bryan, 1977; Singer *et al.*, 2009; Trichopoulos *et al.*, 1975). Esto muestra evidencia sobre la pérdida de diversidad de serotipos presentes en una muestra al emplear el método convencional para el aislamiento de *Salmonella*. Desde el uso de medios de cultivo (Kafel & Bryan, 1977), tiempos de incubación

(Davies *et al.*, 2000) y la selección de colonias para la identificación del serotipo (Berghaus *et al.*, 2013; Harvey & Price, 1967; Singer *et al.*, 2009), por lo que nuestros datos epidemiológicos sobre la prevalencia de serotipos de *Salmonella* están sesgados a lo que podemos identificar (Cox *et al.*, 2011; Singer *et al.*, 2009).

Para soportar esta idea, se realizó un análisis sobre la diversidad de serotipos de *Salmonella* co-ocurriendo en una muestra. Se analizaron 23 aislamientos representativos del muestreo realizado a los 4 supermercados. Se identificaron 5 serotipos previamente mencionados. De las 12 muestras analizadas, el 50% mostró co-ocurrencia de serotipos con al menos 2 serotipos identificados en cada muestra analizada (**Tabla 13**). El sitio mayormente contaminado fue el supermercado 4 con 3 serotipos distintos co-ocurriendo en carne de pollo. En la **Tabla 13** se muestra una o dos muestras representativas de cada supermercado con co-ocurrencia de serotipos en cada una de estas muestras. Resultados similares se han obtenido en otro estudio en donde se determinó que el 91% (20/22) de muestras de pollos presentaron co-ocurrencia de serotipos, en donde la muestra más contaminada presentó 4 serotipos distintos (Thompson *et al.*, 2018). En contraste, en otro estudio se identificó el 6% (44/690) de sus muestras con la presencia de 2 serotipos distintos (Berghaus *et al.*, 2013). La diferencia en el porcentaje de co-ocurrencia de serotipos entre estos estudios puede deberse a que Thompson y colaboradores, realizaron la búsqueda intencionada de co-ocurrencia de serotipos, mientras que en el estudio de Berghaus fue causal, debido al esfuerzo de muestreo realizado y a la tipificación de más de una colonia aislada en cada una de sus muestras.

**Tabla 13.-** Co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en carne de pollo de 4 supermercados.

Supermercado	No. de muestra	No. del duplicado de la muestra	Hora de incubación	Caldo de enriquecimiento	Medio de cultivo	Serogrupo confirmado	Serotipo
SM1	2	3	72	RV	HK	C1	Infantis
		3	72	TT	HK	D	Enteritidis
		3	72	TT	HK	C1	Infantis
	3	5	18	RV	XLD	C1	Infantis
		5	18	TT	HK	D	Enteritidis
		5	24	RV	HK	C1	Infantis
5		24	RV	VB	D	Enteritidis	
SM2	5	9	48	TT	XLD	E	Anatum
		9	48	TT	XLD	E	Anatum
		9	72	RV	XLD	C1	Braenderup
		10	24	TT	XLD	E	Anatum
SM3	7	13	24	TT	VB	E	Anatum
		13	24	TT	XLD	E	Anatum
		13	24	TT	VB	C1	Infantis
	9	17	48	RV	VB	D	Enteritidis
		17	48	TT	VB	D	Enteritidis
SM4	10	17	72	RV	HK	C1	Infantis
		19	24	TT	XLD	B	Agona
		19	48	RV	VB	B	Agona
		19	72	RV	XLD	C1	Infantis
		20	18	TT	HK	D	Enteritidis
		20	18	TT	VB	D	Enteritidis
		20	72	RV	HK	C1	Infantis

La co-ocurrencia de serotipos es un fenómeno del que no se sabe mucho, debido a la complejidad de su detección, a los elevados gastos en insumos y al tiempo requerido para poder llevarla a cabo (Garrido *et al.*, 2014; R. W. S. Harvey & Price, 1967; Kafel & Bryan, 1977a). La propuesta del presente trabajo sobre el uso de la determinante genética *srfC* para determinar serotipos de *Salmonella* en muestras de carne de pollo, podría ayudar facilitando el estudio de este fenómeno. Al mostrar un buen poder discriminatorio entre los serotipos

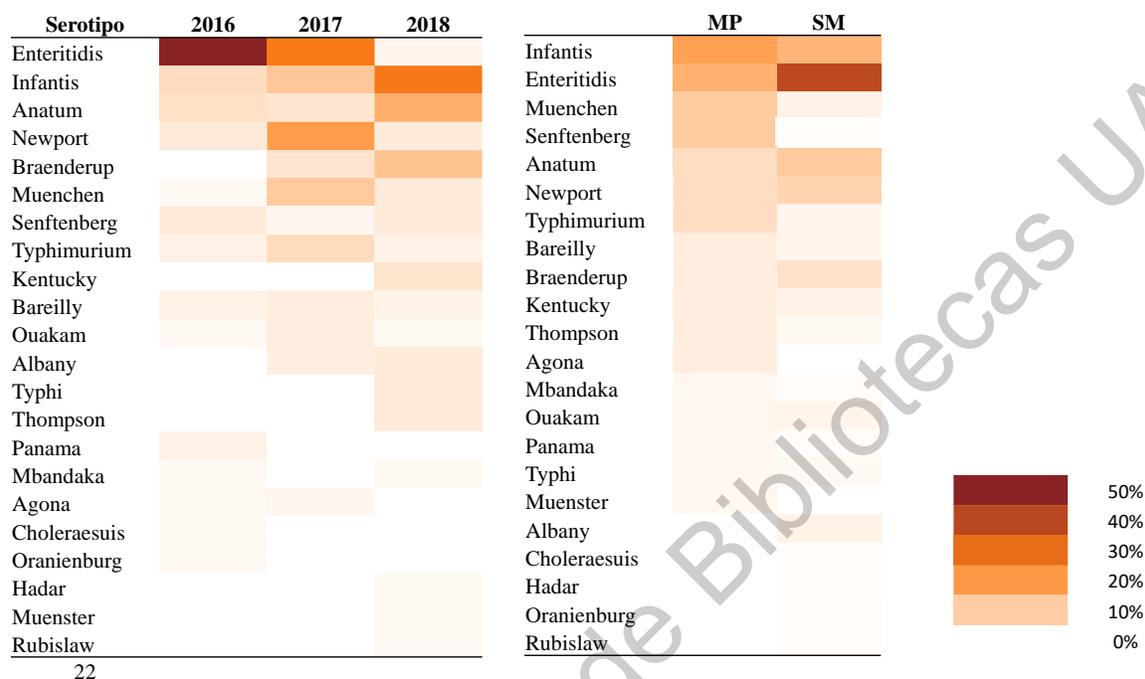
más frecuentes en carne de pollo, y al mostrar especificidad al género *Salmonella*, se podría utilizar en métodos moleculares para determinar la diversidad de serotipos directamente de la muestra.

### 9.5. Diversidad de serotipos de *S. enterica*.

Los aislamientos obtenidos del análisis temporal se genoserotipificaron con el gen *srfC*. En los tres años de estudio se identificaron 22 serotipos distintos de *Salmonella* circulando en carne de pollo (**Figura 11**). Las prevalencias de los serotipos oscilaron entre 1.33% y 62.34%. De manera general, los serotipos mayoritarios fueron Enteritidis ((32.5%) 65/200), Infantis ((15.5%) 31/200), Anatum ((9.5%) 19/200) y Newport ((8) 16/200). La prevalencia de serotipos varía en cada país. En EE. UU. los serotipos mayoritarios son Typhimurium (15.56%), Kentucky (13.56%), Heidelberg (13.41%), y Enteritidis (7.46%) (Nyrabahizi *et al.*, 2020). En Trinidad y Tobago Kentucky (30.9%) y Javiana (22.7%) (Khan *et al.*, 2018). En India Typhimurium (22%), Gallinarum (43.7%) y Enteritidis (30.6%) (Kumar *et al.*, 2019), en Egipto Enteritidis (11.4%), Typhimurium (8.6%) y Kentucky (2.85%) (Elkenany *et al.*, 2019), en Japón Infantis (57.6%), Manhattan (40.3%) y Schwarzengrund (2.1%) (Duc *et al.*, 2019), Colombia Paratyphi B (36.17%), *S. Hvittingfoss* (19.15%) y Muenster (10.64%) (Rodriguez *et al.*, 2015).

Serotipos circulando en pollo en estas otras regiones del mundo (Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Muenster, Anatum e Infantis) coinciden con la diversidad de serotipos identificados en el presente trabajo (**Figura 11**). La diversidad de serotipos varió con el tiempo, encontrando serotipos presentes en los 3 años de estudio (9 serotipos), en 2 años (4 serotipos) y en sólo uno de los años evaluados (9 serotipos). La mayor diversidad de serotipos se obtuvo en el año 2018 (18 serotipos) (**Figura 11**). La diversidad de serotipos por sitio de muestreo fue similar, en supermercados están presentes 20 serotipos y en mercados públicos 17. Se identificaron serotipos presentes en sólo un sitio de muestreo. En supermercados fueron Albany, Typhi, Choleraesuis, Hadar, Oranienburg y Rubislaw, y para mercados públicos Agona y Muenster (**Figura 11**). Algunos estudios han mostrado que ambientes contaminados con una mayor diversidad de serotipos presentan una mayor prevalencia de este patógeno (Garrido *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2019). Este mismo fenómeno se observó en

supermercados, siendo el sitio con mayor diversidad de serotipos (20) y una mayor prevalencia (27.2%) en comparación con mercados públicos con 17 serotipos distintos y una prevalencia de 9.0 %.

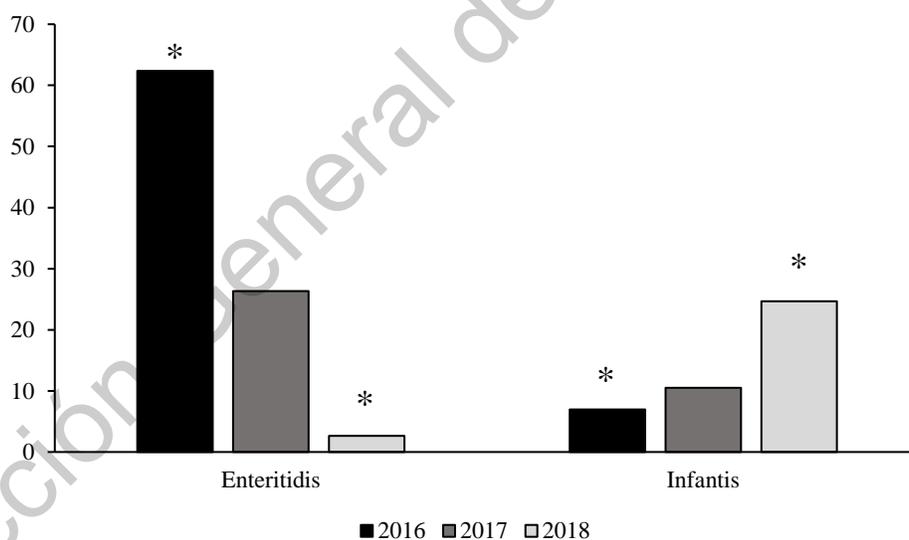


**Figura 11.-** Prevalencia y diversidad de serotipos de *Salmonella* en carne de pollo obtenidos de supermercados (SM) y mercados públicos (MP) durante un periodo de tres años (2016-2018).

En México, la prevalencia del serotipo Gallinarum y su variedad Pullorum eran los serotipos más prevalentes en carne de pollo hasta el año 1994 en donde se emitió una campaña para la erradicación de estas cepas (Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar). En 2012 se emite la declaratoria oficial sobre la erradicación de estas cepas en el sector avícola de México, como producto de este esfuerzo (SENASICA, 2012).

La sucesión ecológica es un proceso natural que se da en las comunidades bacterianas sobre cambios en la composición y abundancia de las especies (Chang & Turner, 2019; Gilliland *et al.*, 2012). Este fenómeno se ha observado en la carne de pollo de México. Al erradicar los serotipos Gallinarum y var. Pullorum, aumentó la prevalencia de *S. Enteritidis*, siendo éste, el serotipo mayoritario que circula en carne de pollo en México (Miranda *et al.*, 2009;

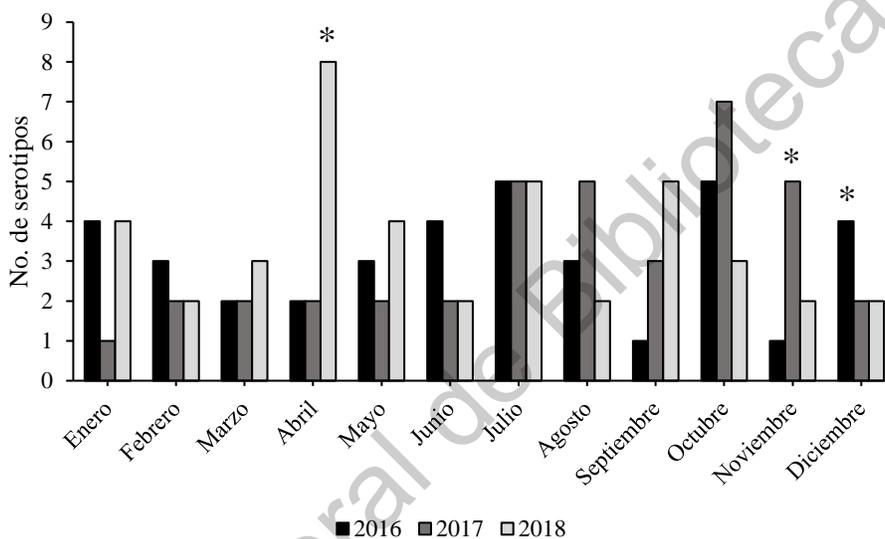
Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017). La sucesión de *S. Enteritidis* por los serotipos Gallinarum y var. Pullorum ha sido previamente reportado en EE. UU. y Europa (Bäumler *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos del presente estudio coinciden con estos reportes, siendo Enteritidis el de mayor prevalencia en pollo ((32.5%) 65/200). Sin embargo, su prevalencia fue disminuyendo significativamente ( $P < 0.002$ ) respecto al tiempo, siendo ésta en 2016 de 62.34% (48/77) y en 2018 2.6% (2/75) (**Figura 12**). Por otra parte, se observó un incremento significativo ( $P < 0.002$ ) del serotipo Infantis, siendo su prevalencia en el año 2016 de 6.5% (5/77) y en 2018 26.7% (20/75) (**Figura 12**). Este cambio en la prevalencia podría deberse a que en México se están utilizando vacunas contra *Salmonella* Enteritidis en granjas de pollo. Algunas marcas de estas vacunas que se distribuyen en México son NOBILIS® SALENVAC T, Poulvac® SE, Salmin Plus, AviPro® Megan® Vac 1. Podríamos estar observando un proceso de sucesión en el que *Salmonella* Infantis se perfila para ser el serotipo mayoritario en carne de pollo y el serotipo Enteritidis formará parte de los serotipos minoritarios o se podría erradicar.



**Figura 12.-** Variación temporal de los serotipos de *Salmonella* Enteritidis e Infantis. Los asteriscos representan diferencia significativa ( $P < 0.002$ ).

Se observó co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* en carne de pollo en los tres años de estudio. Los meses de abril, noviembre y diciembre mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la co-ocurrencia de serotipos en alguno de los años evaluados (**Figura 13**). Es

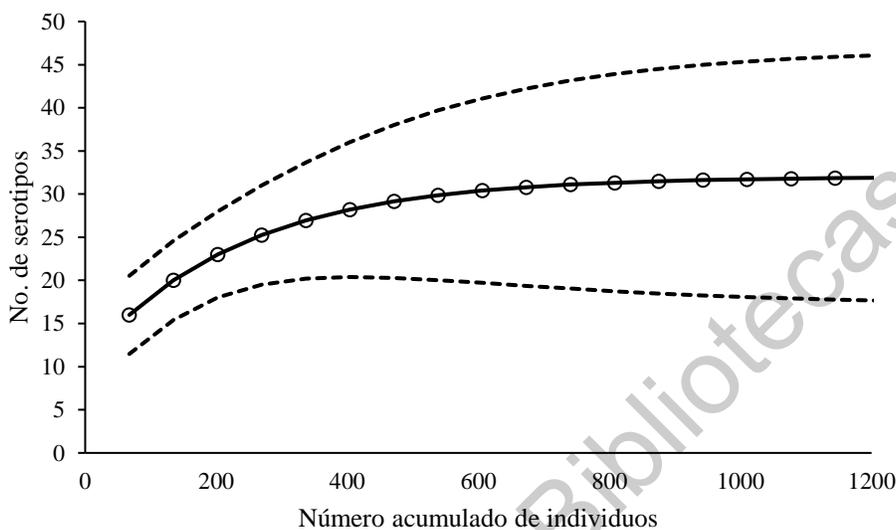
interesante resaltar que el mes de julio mostró una co-ocurrencia constante a lo largo del tiempo. Un evento aislado se observó en el mes de abril del 2018, en el que se identificó la mayor co-ocurrencia de serotipos de *S. enterica* ( $P < 0.0001$ ) respecto a los otros años (Figura 13). La co-ocurrencia de serotipos en carne de pollo fue muy variable respecto al tiempo. Esta variabilidad podría explicarse por factores independientes; como el manejo de la carne, contaminación cruzada y la falta de higiene en el almacenamiento del producto, más que por un factor asociado al tiempo como la estacionalidad.



**Figura 13.-** Co-ocurrencia mensual de serotipos de *S. enterica* en carne de pollo. Datos obtenidos del análisis temporal (2016 – 2018) de prevalencia de *S. enterica* en supermercados y mercados públicos de Querétaro.

Se realizó un análisis de rarefacción para evaluar la diversidad de serotipos circulando en carne de pollo. Los datos de los estimadores no paramétricos (ACE, ICE, Chao2 y Bootstrap) indicaron que la diversidad real de serotipos en carne de pollo varía entre 26 y 46 serotipos (Figura 14). El porcentaje estimado de recuperación de serotipos fue de 76.28 %, este porcentaje indica que se logró tener una buena representación de sobre la diversidad de serotipos en carne de pollo. Existen serotipos que son difíciles de aislar, y estos forman parte de los menos prevalentes (Kafel & Bryan, 1977). Para obtener un mejor porcentaje sobre la diversidad de serotipos presentes en carne de pollo, sería necesario modificar el método de aislamiento (Kafel & Bryan, 1977; Rostagno *et al.*, 2005; Trichopoulos *et al.*, 1975), ampliar

la identificación del número de aislamientos (R. W. Harvey & Price, 1967) y/o utilizar herramientas moleculares (Braun *et al.*, 2012; Fresno *et al.*, 2014b; Vinayaka *et al.*, 2019; Zou *et al.*, 2016) para la identificación de la diversidad de serotipos presentes una muestra.



**Figura 14.-** Análisis de rarefacción sobre la diversidad de serotipos de *Salmonella* presentes en carne de pollo – análisis temporal (2016 – 2018).

## 10. Conclusiones

Como resultado de la búsqueda sobre determinantes genéticas asociadas a serotipos de *S. enterica*, el gen *srfC* mostró tener la capacidad para diferenciar al menos 79 serotipos. El análisis de secuencias de ADN obtenidas a través de iniciadores dirigidos al gen *srfC* resultó ser adecuado para discernir entre serotipos de *S. enterica*. A pesar de que algunos serotipos fueron difíciles de identificar, se obtuvo 100 % de concordancia con la identificación de 14 serotipos en cepas de referencia y 125 serotipos distintos en secuencias referencia obtenidas del análisis bioinformático. A través del análisis de secuencias del gen *srfC* se pudo identificar co-ocurrencia de serotipos en 50% (6/12) de muestras de pollo expedidas de supermercados. Además, se pudo describir la diversidad de serotipos en aislamientos de *S. enterica* obtenidos de un análisis temporal (2016 – 2018) en muestras de pollo expedidas en supermercados y mercados públicos, identificando 22 distintos serotipos, siendo Enteritidis,

Infantis y Anatum los más prevalentes y Choleraesuis, Hadar, Oranienburg y Rubislaw los menos prevalentes.

## 11. Bibliografía

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L. H., Brisse, S., & *S. enterica* MLST Study Group. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*, 17(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
- Agroalimentaria, S. N. de S., Inocuidad y Calidad. (s/f). *Declaran a México libre de salmonelosis aviar*. gov.mx. Recuperado el 18 de noviembre de 2021, de <http://www.gob.mx/senasica/prensa/declaran-a-mexico-libre-de-salmonelosis-aviar>
- Alali, W. Q., Gaydashov, R., Petrova, E., Panin, A., Tugarinov, O., Kulikovskii, A., Mamleeva, D., Walls, I., & Doyle, M. P. (2012). Prevalence of *Salmonella* on retail chicken meat in Russian Federation. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1469–1473. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-080>
- Bäumler, A. J., Hargis, B. M., & Tsolis, R. M. (2000). Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5450), 50–52. <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.50>
- Berghaus, R. D., Thayer, S. G., Law, B. F., Mild, R. M., Hofacre, C. L., & Singer, R. S. (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(13), 4106–4114. <https://doi.org/10.1128/AEM.00836-13>
- Bergholz, T. M., Moreno Switt, A. I., & Wiedmann, M. (2014). Omics approaches in food safety: Fulfilling the promise? *Trends in Microbiology*, 22(5), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.006>

- Borges, K. A., Furian, T. Q., Borsoi, A., Moraes, H. L. S., Salle, C. T. P., & Nascimento, V. P. (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 1416–1422. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200004>
- Borges, K. A., Furian, T. Q., Souza, S. N., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. S., & Nascimento, V. P. (2019). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Salmonella* Enterica Serotypes Isolated from Poultry Sources in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0827>
- Braun, S. D., Ziegler, A., Methner, U., Slickers, P., Keiling, S., Monecke, S., & Ehricht, R. (2012). Fast DNA serotyping and antimicrobial resistance gene determination of *Salmonella* enterica with an oligonucleotide microarray-based assay. *PLoS One*, 7(10), e46489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046489>
- Caldwell, D. J., Hargis, B. M., Corrier, D. E., Vidal, L., & DeLoach, J. R. (1995a). Evaluation of Persistence and Distribution of *Salmonella* Serotype Isolation from Poultry Farms Using Drag-Swab Sampling. *Avian Diseases*, 39(3), 617–621. <https://doi.org/10.2307/1591816>
- Caldwell, D. J., Hargis, B. M., Corrier, D. E., Vidal, L., & DeLoach, J. R. (1995b). Evaluation of persistence and distribution of *Salmonella* serotype isolation from poultry farms using drag-swab sampling. *Avian Diseases*, 39(3), 617–621.
- Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & del Camino García-Fernández, M. (2003). Occurrence of *Salmonellae* in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00195-2)
- Cardona-Castro, N., Sánchez-Jiménez, M., Lavalett, L., Muñoz, N., & Moreno, J. (2009). Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(3), 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.003>
- Caruana, E. J., Roman, M., Hernández-Sánchez, J., & Solli, P. (2015). Longitudinal studies. *Journal of Thoracic Disease*, 7(11), E537-540. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.63>
- Chang, C. C., & Turner, B. L. (2019). Ecological succession in a changing world. *Journal of Ecology*, 107(2), 503–509. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13132>
- Chin, W. H., Sun, Y., Høgberg, J., Quyen, T. L., Engelsmann, P., Wolff, A., & Bang, D. D. (2017). Direct PCR - A rapid method for multiplexed detection of different serotypes of *Salmonella* in enriched pork meat samples. *Molecular and Cellular Probes*, 32, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.11.004>
- Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
- Christensen, H., & Olsen, J. E. (1998). Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of atpD encoding the  $\beta$  subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiology Letters*, 161(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12933.x>
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., Castro-del Campo, N., Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., & Castro-del Campo, N. (2019). Los últimos 50 años de *Salmonella* en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista bio ciencias*, 6(SPE). <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e540>
- Cortina-Borja, M., Smith, A. D., Combarros, O., & Lehmann, D. J. (2009). The synergy factor: A statistic to measure interactions in complex diseases. *BMC Research Notes*, 2(1), 105. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-105>

- Cox, N. A., Ja, C., & Lj, R. (2011). Minimization of *Salmonella* contamination on raw poultry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133715>
- Davies, P., Funk, J., & Morrow, W. E. M. (1999). Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Journal of Swine Health and Production*, 7(5), 231–234.
- Davies, P. r., Turkson, P. k., Funk, J. a., Nichols, M. a., Ladely, S. r., & Fedorka-Cray, P. j. (2000). Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 89(1), 169–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01101.x>
- Duc, V. M., Nakamoto, Y., Fujiwara, A., Toyofuku, H., Obi, T., & Chuma, T. (2019). Prevalence of *Salmonella* in broiler chickens in Kagoshima, Japan in 2009 to 2012 and the relationship between serovars changing and antimicrobial resistance. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1836-6>
- Elkenany, R., Elsayed, M. M., Zakaria, A. I., El-sayed, S. A.-E.-S., & Rizk, M. A. (2019). Antimicrobial resistance profiles and virulence genotyping of *Salmonella* enterica serovars recovered from broiler chickens and chicken carcasses in Egypt. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1867-z>
- Fearnley, E., Raupach, J., Lagala, F., & Cameron, S. (2011). *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.004>
- Ferrato, C., Chui, L., King, R., & Louie, M. (2017). Utilization of a molecular serotyping method for *Salmonella* enterica in a routine laboratory in Alberta Canada. *Journal of Microbiological Methods*, 135, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.018>
- Franklin, K., Lingohr, E. J., Yoshida, C., Anjum, M., Bodrossy, L., Clark, C. G., Kropinski, A. M., & Karmali, M. A. (2011). Rapid genoserotyping tool for classification of *Salmonella* serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 2954–2965. <https://doi.org/10.1128/JCM.02347-10>
- Fresno, M., Barreto, M., Gutierrez, S., Dougnac, C., Abalos, P., & Retamal, P. (2014a). Serotype-associated polymorphisms in a partial rpoB gene sequence of *Salmonella* enterica. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(3), 177–181. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0872>
- Fresno, M., Barreto, M., Gutierrez, S., Dougnac, C., Abalos, P., & Retamal, P. (2014b). Serotype-associated polymorphisms in a partial rpoB gene sequence of *Salmonella* enterica. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(3), 177–181. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0872>
- Funk, J. A., Davies, P. R., & Nichols, M. A. (2001). Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology*, 83(1), 45–60. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00404-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00404-7)
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M. A., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F. J., Wegener, H. C., & World Health Organization Global Salm-Surv. (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3), 381–388. <https://doi.org/10.3201/eid1205.050854>
- Garrido, V., Sánchez, S., San Román, B., Zabalza-Baranguá, A., Díaz-Tendero, Y., de Frutos, C., Mainar-Jaime, R.-C., & Grilló, M.-J. (2014). Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC Veterinary Research*, 10, 59. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-59>
- Ghafir, Y., China, B., Korsak, N., Dierick, K., Collard, J.-M., Godard, C., De Zutter, L., & Daube, G. (2005). Belgian surveillance plans to assess changes in *Salmonella* prevalence in meat at different production stages. *Journal of Food Protection*, 68(11), 2269–2277. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.11.2269>

- Gicquelais, R. E., Morris, J. F., Matthews, S., Gladden, L., Safi, H., Grayson, C., Slayton, R. B., Newton, A. E., Bordonaro, R., Wheeler, J. G., Smith, N., Bosch, S. A., Haselow, D. T., Arkansas Department of Health, & Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Multiple-serotype *Salmonella* outbreaks in two state prisons—Arkansas, August 2012. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(8), 169–173.
- Gilliland, M. G., Erb-Downward, J. R., Bassis, C. M., Shen, M. C., Toews, G. B., Young, V. B., & Huffnagle, G. B. (2012). Ecological Succession of Bacterial Communities during Conventionalization of Germ-Free Mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2359–2366. <https://doi.org/10.1128/AEM.05239-11>
- Giombelli, A., & Gloria, M. B. A. (2014). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on broiler chickens from farm to slaughter and efficiency of methods to remove visible fecal contamination. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1851–1859. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-200>
- Gkana, E. N., Doulgeraki, A. I., & Nychas, G.-J. E. (2017). Survival and transfer efficacy of mixed strain *Salmonella* enterica ser. Typhimurium from beef burgers to abiotic surfaces and determination of individual strain contribution. *Meat Science*, 130, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.006>
- Gorski, L. (2012). Selective enrichment media bias the types of *Salmonella* enterica strains isolated from mixed strain cultures and complex enrichment broths. *PloS One*, 7(4), e34722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034722>
- Gu, G., Strawn, L. K., Zheng, J., Reed, E. A., & Rideout, S. L. (2019). Diversity and Dynamics of *Salmonella* enterica in Water Sources, Poultry Litters, and Field Soils Amended With Poultry Litter in a Major Agricultural Area of Virginia. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2868. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02868>
- Gunn, J. S., Marshall, J. M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R. C., & Ryan, E. T. (2014). *Salmonella* chronic carriage: Epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence. *Trends in microbiology*, 22(11), 648–655. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.06.007>
- Gupta, R., Gaiind, R., Singh, L. C., Paglietti, B., Deb, M., Rubino, S., Wain, J., & Basir, S. F. (2016). Detection of mutations in *gyrB* using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) among *Salmonella* enterica serovar Typhi and Paratyphi A. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(12), 684–689. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trx002>
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., & Weitz, J. S. (2013). Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *The ISME Journal*, 7(6), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.10>
- Harrison, W. A., Griffith, C. J., Tennant, D., & Peters, A. C. (2001). Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales. *Letters in Applied Microbiology*, 33(6), 450–454. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.01031.x>
- Harvey, R. W., & Price, T. H. (1967). The examination of samples infected with multiple *Salmonella* serotypes. *The Journal of Hygiene*, 65(3), 423–434.
- Hendriksen, R. S., Mikoleit, M., Carlson, V. P., Karlsmose, S., Vieira, A. R., Jensen, A. B., Seyfarth, A. M., DeLong, S. M., Weill, F.-X., Lo Fo Wong, D. M. A., Angulo, F. J., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2009). WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2729–2736. <https://doi.org/10.1128/JCM.02437-08>
- Herrera-León, S., McQuiston, J. R., Usera, M. A., Fields, P. I., Garaizar, J., & Echeita, M. A. (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella*

- spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2581–2586. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2581-2586.2004>
- Hong, S., Rovira, A., Davies, P., Ahlstrom, C., Muellner, P., Rendahl, A., Olsen, K., Bender, J. B., Wells, S., Perez, A., & Alvarez, J. (2016). Serotypes and Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Recovered from Clinical Samples from Cattle and Swine in Minnesota, 2006 to 2015. *PLOS ONE*, 11(12), e0168016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168016>
- Hormaeche, E., Surraco, N. L., Peluffo, C. A., & Aleppo, P. L. (1943). CAUSES OF INFANTILE SUMMER DIARRHEA. *American Journal of Diseases of Children*, 66(5), 539–551. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1943.02010230071008>
- Huang, J., Zong, Q., Zhao, F., Zhu, J., & Jiao, X. (2016). Quantitative surveys of *Salmonella* and *Campylobacter* on retail raw chicken in Yangzhou, China. *Food Control*, 59, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.009>
- Hughes, J. B., & Hellmann, J. J. (2005). The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods in Enzymology*, 397, 292–308. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)97017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)97017-1)
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., & Weill, F.-X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
- Jones, T. F., Ingram, L. A., Cieslak, P. R., Vugia, D. J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., Medus, C., Cronquist, A., & Angulo, F. J. (2008). Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(1), 109–114. <https://doi.org/10.1086/588823>
- Kafel, S., & Bryan, F. L. (1977). Effects of enrichment media and incubation conditions on isolating *Salmonellae* from ground-meat filtrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(3), 285–291. <https://doi.org/10.1128/aem.34.3.285-291.1977>
- Khan, A. S., Georges, K., Rahaman, S., Abdela, W., & Adesiyun, A. A. (2018). Prevalence and serotypes of *Salmonella* spp. On chickens sold at retail outlets in Trinidad. *PLOS ONE*, 13(8), e0202108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202108>
- Kumar, Y., Singh, V., Kumar, G., Gupta, N. K., & Tahlan, A. K. (2019). Serovar diversity of *Salmonella* among poultry. *The Indian Journal of Medical Research*, 150(1), 92–95. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1798\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1798_17)
- Kushwaha, S. K., Bhavesh, N. L. S., Abdella, B., Lahiri, C., & Marathe, S. A. (2020). The phylogenomics of CRISPR-Cas system and revelation of its features in *Salmonella*. *Scientific Reports*, 10(1), 21156. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77890-6>
- Lavalett, L., Sánchez, M. M., Muñoz, N., Moreno, J., & Cardona-Castro, N. (2009). [Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction for molecular identification of *Salmonella enterica* serogroups B, C2, D and E]. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 29(2), 244–252.
- Lehmacher, A., Bockemühl, J., & Aleksic, S. (1995). Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and Infection*, 115(3), 501–511. <https://doi.org/10.1017/s0950268800058660>
- Liu, B., Zhang, L., Zhu, X., Shi, C., Chen, J., Liu, W., He, X., & Shi, X. (2011). PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.010>

- Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., & Shi, X. (2012). Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella* enterica Typhimurium and Enteritidis. *Food Control*, 27(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.062>
- Liu, T., Liljebjelke, K., Bartlett, E., Hofacre, C., Sanchez, S., & Maurer, J. J. (2002). Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1227–1232.
- Liu, Y., Zhang, D.-F., Zhou, X., Xu, L., Zhang, L., & Shi, X. (2017). Comprehensive Analysis Reveals Two Distinct Evolution Patterns of *Salmonella* Flagellin Gene Clusters. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2604. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02604>
- Manafi, M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 205–218.
- McQuiston, J. R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F., & Fields, P. I. (2004). Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1923–1932.
- Minami, A., Chaicumpa, W., Chongsa-Nguan, M., Samosornsuk, S., Monden, S., Takeshi, K., Makino, S., & Kawamoto, K. (2010). Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. *Food Control*, 21(3), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.011>
- Miranda, J. M., Mondragón, A. C., Martínez, B., Guarddon, M., & Rodríguez, J. A. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection*, 72(5), 966–971. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.5.966>
- Nadon, C., Van Walle, I., Gerner-Smidt, P., Campos, J., Chinen, I., Concepcion-Acevedo, J., Gilpin, B., Smith, A. M., Man Kam, K., Perez, E., Trees, E., Kubota, K., Takkinen, J., Nielsen, E. M., Carleton, H., & FWD-NEXT Expert Panel. (2017). PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 22(23). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544>
- Ni, P., Xu, Q., Yin, Y., Liu, D., Zhang, J., Wu, Q., Tian, P., Shi, X., & Wang, D. (2018). Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars isolated from farm products in Shanghai. *Food Control*, 85, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.009>
- Nutrition, C. for F. S. and A. (s/f). *Bad Bug Book (Second Edition)* [WebContent]. Recuperado el 29 de mayo de 2017, de <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/>
- Nyirabahizi, E., Tyson, G. H., Tate, H., Kabera, C., Creary, E., Ayers, S., & Strain, E. (2020). Northeastern U.S. *Salmonella* Strains from Retail Meat Are More Prevalent and More Resistant to Antimicrobials. *Journal of Food Protection*, 83(5), 849–857. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-549>
- Oladeinde, A., Cook, K., Lakin, S. M., Woyda, R., Abdo, Z., Looft, T., Herrington, K., Zock, G., Lawrence, J. P., Thomas, J. C., Beaudry, M. S., & Glenn, T. (2019). Horizontal Gene Transfer and Acquired Antibiotic Resistance in *Salmonella* enterica Serovar Heidelberg following In Vitro Incubation in Broiler Ceca. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(22), e01903-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01903-19>
- Olitzky, I., Rosenthal, M. H., & Copeland, J. R. (1956). FAMILY INFECTION WITH MULTIPLE *SALMONELLA* TYPES INCLUDING TWO H<sub>2</sub>S NEGATIVE VARIANTS. *Journal of Bacteriology*, 72(4), 569–570.
- Olsen, J. E., Brown, D. J., Skov, M. N., & Christensen, J. P. (1993). Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock.

- The Veterinary Quarterly*, 15(4), 125–135.  
<https://doi.org/10.1080/01652176.1993.9694390>
- Outbreaks Involving Salmonella* / CDC. (2021, octubre 23).  
<https://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks.html>
- Paine, S., Thornley, C., Wilson, M., Dufour, M., Sexton, K., Miller, J., King, G., Bell, S., Bandaranayake, D., & Mackereth, G. (2014). An Outbreak of Multiple Serotypes of *Salmonella* in New Zealand Linked to Consumption of Contaminated Tahini Imported from Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(11), 887–892. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1773>
- Perera, N., Geary, C., Wiselka, M., Rajakumar, K., & Andrew Swann, R. (2007). Mixed *Salmonella* Infection: Case Report and Review of the Literature. *Journal of Travel Medicine*, 14(2), 134–135. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2007.00111.x>
- Pesquera, S. de I. A. y. (s/f). *Boletín mensual de avance de la producción de carne en canal de ave*. gov.mx. Recuperado el 11 de agosto de 2021, de <http://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-mensual-de-avances-de-la-produccion-de-carne-de-ave>
- Peters, T., Bertrand, S., Björkman, J. T., Brandal, L. T., Brown, D. J., Erdösi, T., Heck, M., Ibrahim, S., Johansson, K., Kornschober, C., Kotila, S. M., Le Hello, S., Lienemann, T., Mattheus, W., Nielsen, E. M., Ragimbeau, C., Rumore, J., Sabol, A., Torpdahl, M., ... de Pinna, E. (2017). Multi-laboratory validation study of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, 2015. *Eurosurveillance*, 22(9), 30477. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.9.30477>
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G., & Elliott, P. H. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919–1936.
- Popa, G. L., & Papa, M. I. (2021). *Salmonella* spp. Infection—A continuous threat worldwide. *Germs*, 11(1), 88–96. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J., & Gheesling, L. L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 155(7), 568–570. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.005>
- Pratap, C. B., Kumar, G., Patel, S. K., Shukla, V. K., Kumar, K., Singh, T. B., & Nath, G. (2014). Mix-infection of *S. Typhi* and *ParaTyphi A* in Typhoid Fever and Chronic Typhoid Carriers: A Nested PCR Based Study in North India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(11), DC09–DC14. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9167.5107>
- Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia*. (s/f). Recuperado el 11 de agosto de 2021, de <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>
- Roberts, D., Boag, K., Hall, M. L. M., & Shipp, C. R. (1975). The isolation of *Salmonellas* from British pork sausages and sausage meat. *Epidemiology & Infection*, 75(2), 173–184. <https://doi.org/10.1017/S0022172400047203>
- Rodríguez, J. M., Rondón, I. S., & Verjan, N. (2015). Serotypes of *Salmonella* in Broiler Carcasses Marketed at Ibagué, Colombia. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17, 545–552. <https://doi.org/10.1590/1516-635X1704545-552>
- Rostagno, M. H., Gailey, J. K., Hurd, H. S., Mckean, J. D., & Leite, R. C. (2005). Culture Methods Differ on the Isolation of *Salmonella Enterica* Serotypes from Naturally Contaminated Swine Fecal Samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(1), 80–83. <https://doi.org/10.1177/104063870501700118>
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A. W., & ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). (2013). Overview of

- molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 18(4), 20380.
- Salud, S. de. (2020). *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información*. gob.mx. Recuperado el 11 de agosto de 2021, de <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
- Samuel, J. L., Eccles, J. A., & Francis, J. (1981). *Salmonella* in the intestinal tract and associated lymph nodes of sheep and cattle. *The Journal of Hygiene*, 87(2), 225–232.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Schierstaedt, J., Jechalke, S., Nesme, J., Neuhaus, K., Sørensen, S. J., Grosch, R., Smalla, K., & Schikora, A. (2020). *Salmonella* persistence in soil depends on reciprocal interactions with indigenous microorganisms. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2639–2652. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14972>
- Schrader, K. N., Fernandez-Castro, A., Cheung, W. K. W., Crandall, C. M., & Abbott, S. L. (2008). Evaluation of Commercial Antisera for *Salmonella* Serotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 685–688. <https://doi.org/10.1128/JCM.01808-07>
- Seong, W.-J., Kwon, H.-J., Kim, T.-E., Lee, D.-Y., Park, M.-S., & Kim, J.-H. (2012). Molecular serotyping of *Salmonella* enterica by complete rpoB gene sequencing. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 50(6), 962–969. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2547-x>
- Serotypes and the Importance of Serotyping Salmonella | Salmonella Atlas | Reports and Publications | Salmonella | CDC*. (2020, febrero 21). <https://www.cdc.gov/Salmonella/reportspubs/Salmonella-atlas/serotyping-importance.html>
- Shafini, A. B., Son, R., Mahyudin, N. A., Rukayadi, Y., & Tuan Zainazor, T. C. (2017). Prevalence of *Salmonella* spp. In chicken and beef from retail outlets in Malaysia. *International Food Research Journal*, 24(1), 437–449.
- Singer, R. S., Mayer, A. E., Hanson, T. E., & Isaacson, R. E. (2009). Do Microbial Interactions and Cultivation Media Decrease the Accuracy of *Salmonella* Surveillance Systems and Outbreak Investigations? *Journal of Food Protection*, 72(4), 707–713. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.4.707>
- Sivaramalingam, T., McEwen, S. A., Pearl, D. L., Ojkic, D., & Guerin, M. T. (2013). A temporal study of *Salmonella* serovars from environmental samples from poultry breeder flocks in Ontario between 1998 and 2008. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(1), 1–11.
- Søborg, D. A., Hendriksen, N. B., Kilian, M., & Kroer, N. (2013). Widespread Occurrence of Bacterial Human Virulence Determinants in Soil and Freshwater Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5488–5497. <https://doi.org/10.1128/AEM.01633-13>
- Sukhnanand, S., Alcaine, S., Warnick, L. D., Su, W.-L., Hof, J., Craver, M. P. J., McDonough, P., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2005). DNA Sequence-Based Subtyping and Evolutionary Analysis of Selected *Salmonella* enterica Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3688–3698. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.3688-3698.2005>
- Sultan, B. A., Fasih, N., Qaiser, S., Khan, E., Zafar, A., & Irfan, S. (2013). Mixed *Salmonella* infection: A report of two cases from the Aga Khan University Hospital, Karachi. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(4), 524–526.
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Liebana, E., Kornschober, C., Allerberger, F., Hächler, H., & Bodrossy, L. (2007). MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for

- molecular typing of *Salmonella* enterica subsp. Enterica serovars. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.013>
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Stralis-Pavese, N., Liebana, E., Kornschöber, C., Allerberger, F., Hächler, H., & Bodrossy, L. (2008). Development of an oligonucleotide microarray method for *Salmonella* serotyping. *Microbial biotechnology*, 1(6), 513–522. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00053.x>
- The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. (2010). *EFSA Journal*, 8(1), n/a-n/a. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1496>
- Thompson, C. P., Doak, A. N., Amirani, N., Schroeder, E. A., Wright, J., Kariyawasam, S., Lamendella, R., & Shariat, N. W. (2018). High-Resolution Identification of Multiple *Salmonella* Serovars in a Single Sample by Using CRISPR-SeroSeq. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), e01859-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01859-18>
- Timme, R. E., Pettengill, J. B., Allard, M. W., Strain, E., Barrangou, R., Wehnes, C., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Musser, S. M., & Brown, E. W. (2013). Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella* enterica subsp. Enterica inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome Biology and Evolution*, 5(11), 2109–2123. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt159>
- Trichopoulos, D., Papadakis, J. A., Karalis, D., & Vassiliadis, P. (1975). Incubation at raised temperature of enrichment media, combined with secondary enrichment in Rappaport's medium, for the isolation of *Salmonellas* from sewage. *Epidemiology & Infection*, 74(2), 205–213. <https://doi.org/10.1017/S0022172400024268>
- V. T. Nair, D., Venkitanarayanan, K., & Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods*, 7(10), 167. <https://doi.org/10.3390/foods7100167>
- van der Zee, H. (1994). Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella* enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 21(1–2), 41–46.
- Villalpando-Guzmán, S., Vázquez-Quiñones, C. R., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Quiñones-Ramírez, E. I., Vázquez-Salinas, C., Villalpando-Guzmán, S., Vázquez-Quiñones, C. R., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2017). Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella* enterica aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 458–466. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500458>
- Vinayaka, A. C., Ngo, T. A., Kant, K., Engelsmann, P., Dave, V. P., Shahbazi, M.-A., Wolff, A., & Bang, D. D. (2019). Rapid detection of *Salmonella* enterica in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosensors & Bioelectronics*, 129, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.078>
- Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2016). Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. *PLoS One*, 11(7), e0159567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>
- Wang, L. Y. R., Jokinen, C. C., Laing, C. R., Johnson, R. P., Ziebell, K., & Gannon, V. P. J. (2018). Multi-Year Persistence of Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Closed Canadian Beef Herd: A Cohort Study. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02040>
- Wang, Y., Chen, Q., Cui, S., Xu, X., Zhu, J., Luo, H., Wang, D., & Li, F. (2014). Enumeration and characterization of *Salmonella* isolates from retail chicken carcasses in Beijing, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(2), 126–132. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1586>

- Wattiau, P., Boland, C., & Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives  $\nabla$ . *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7877–7885. <https://doi.org/10.1128/AEM.05527-11>
- Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3687–3694. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003>
- Yang, S.-M., Baek, J., Kim, E., Kim, H.-B., Ko, S., Kim, D., Yoon, H., & Kim, H.-Y. (2021). Development of a Genoserotyping Method for *Salmonella* Infantis Detection on the Basis of Pangenome Analysis. *Microorganisms*, 9(1), 67. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010067>
- Yang, X., Noyes, N. R., Doster, E., Martin, J. N., Linke, L. M., Magnuson, R. J., Yang, H., Geornaras, I., Woerner, D., Jones, K. L., Ruiz, J., Boucher, C., Morley, P. S., & Belk, K. E. (2016). Use of metagenomic shotgun sequencing technology to detect foodborne pathogens within their microbiome in beef production chain. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.00078-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00078-16>
- Yoshida, C. E., Kruczkiewicz, P., Laing, C. R., Lingohr, E. J., Gannon, V. P. J., Nash, J. H. E., & Taboada, E. N. (2016). The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies. *PloS One*, 11(1), e0147101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147101>
- Yoshida, C., Lingohr, E. J., Trognitz, F., MacLaren, N., Rosano, A., Murphy, S. A., Villegas, A., Polt, M., Franklin, K., Kostic, T., Kropinski, A. M., & Card, R. M. (2014). Multi-laboratory evaluation of the rapid genoserotyping array (SGSA) for the identification of *Salmonella* serovars. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(3), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.006>
- Zaidi, M. B., Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., Lopez, E., Contreras, J., Abbott, J., Zhao, S., McDermott, P., & Tollefson, L. (2008). Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 429–435. <https://doi.org/10.3201/eid1403.071057>
- Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., Leon, V., Canche, C., Hubert, S. K., Abbott, J., León, M., Zhao, S., Headrick, M., & Tollefson, L. (2006). Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(1), 21–28. <https://doi.org/10.1086/498508>
- Zhu, J., Wang, Y., Song, X., Cui, S., Xu, H., Yang, B., Huang, J., Liu, G., Chen, Q., Zhou, G., Chen, Q., & Li, F. (2014). Prevalence and quantification of *Salmonella* contamination in raw chicken carcasses at the retail in China. *Food Control*, 44, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.050>
- Ziemer, C. J., & Steadham, S. R. (2003). Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6), 463–469. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01430.x>
- Zou, Q.-H., Li, R.-Q., Liu, G.-R., & Liu, S.-L. (2016). Genotyping of *Salmonella* with lineage-specific genes: Correlation with serotyping. *International Journal of Infectious Diseases*, 49, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.029>

## 12. Anexos

**Tabla 7.** Análisis temporal de la prevalencia de *Salmonella* a través del tiempo.

	No. de muestras	Prevalencia (%)	95% CI
<b>General</b>			
2016 - 2018	720	20.7	17.9 - 23.8
<b>Anual</b>			
2016	240	13.3	9.6 - 18.2
2017	240	21.7	16.7 - 27.5
2018	240	27.1	21.7 - 33.3
<b>Estacional</b>			
Primavera	180	17.8	12.9 - 24.0
Verano	180	20.0	14.8 - 26.4
Otoño	180	23.3	17.8 - 30.0
Invierno	180	21.7	16.3 - 28.3
<b>Mensual</b>			
Enero	60	20.0	11.8 - 31.8
Febrero	60	20.0	11.8 - 31.8
Marzo	60	15.0	8.1 - 26.1
Abril	60	21.7	13.1 - 33.6
Mayo	60	16.7	9.3 - 28.0
Junio	60	13.3	6.9 - 24.1
Julio	60	25.0	15.8 - 37.2
Agosto	60	21.7	13.1 - 33.6
Septiembre	60	20.0	11.8 - 31.8
Octubre	60	20.0	11.8 - 31.8
Noviembre	60	30.0	19.9 - 42.5
Diciembre	60	25.0	15.8 - 37.2

**Tabla 8.** Efecto estacional sobre la prevalencia de *Salmonella* por año.

<b>Estación</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>
Primavera	9/60 (15) <sup>ab</sup>	10/60 (16.7) <sup>a</sup>	13/60 (21.7) <sup>a</sup>
Verano	5/60 (8.3) <sup>b</sup>	15/60 (25.0) <sup>a</sup>	16/60 (26.7) <sup>a</sup>
Otoño	5/60 (8.3) <sup>b</sup>	18/60 (30.0) <sup>a</sup>	19/60 (31.7) <sup>a</sup>
Invierno	13/60 (21.7) <sup>a</sup>	9/60 (15.0) <sup>a</sup>	17/60 (28.3) <sup>a</sup>

Dirección General de Bibliotecas UAQ

**Tabla 9.** Análisis Odds ratio sobre la prevalencia temporal de *Salmonella*.

	Odds ratio	Intervalos de confianza 95 %	Valor de P
<b>General</b>			
2016 - 2018	2.4	1.5 - 3.8	<i>P</i> < 0.001
<b>Mensual</b>			
Enero	3.8	0.9 - 16.0	<i>P</i> = 0.0635
Febrero	16.8	2.0 - 140.9	<i>P</i> = 0.0094
Marzo	4.3	0.8 - 22.5	<i>P</i> = 0.0880
Abril	4.5	1.1 - 18.5	<i>P</i> = 0.0371
Mayo	12.4	1.5 - 105.7	<i>P</i> = 0.0211
Junio	3.5	0.6 - 19.0	<i>P</i> = 0.1464
Julio	0.8	0.2 - 2.6	<i>P</i> = 0.7657
Agosto	0.8	0.2 - 2.8	<i>P</i> = 0.7542
Septiembre	0.7	0.2 - 2.4	<i>P</i> = 0.5202
Octubre	7.0	1.4 - 35.5	<i>P</i> = 0.0188
Noviembre	9.0	2.2 - 36.2	<i>P</i> = 0.0020
Diciembre	25.4	3.1 - 211.1	<i>P</i> = 0.0028
<b>Estación</b>			
Primavera	5.7	2.2 - 14.6	<i>P</i> = 0.0003
Verano	1.2	0.6 - 2.4	<i>P</i> = 0.7095
Otoño	3.25	1.5 - 6.9	<i>P</i> = 0.0020
Invierno	10.3	3.8 - 28.0	<i>P</i> < 0.0001
<b>Anual</b>			
2016	2.5	1.1 - 5.5	<i>P</i> = 0.0259
2017	3.1	1.6 - 6.1	<i>P</i> = 0.0008
2018	5.0	2.6 - 9.6	<i>P</i> < 0.0001

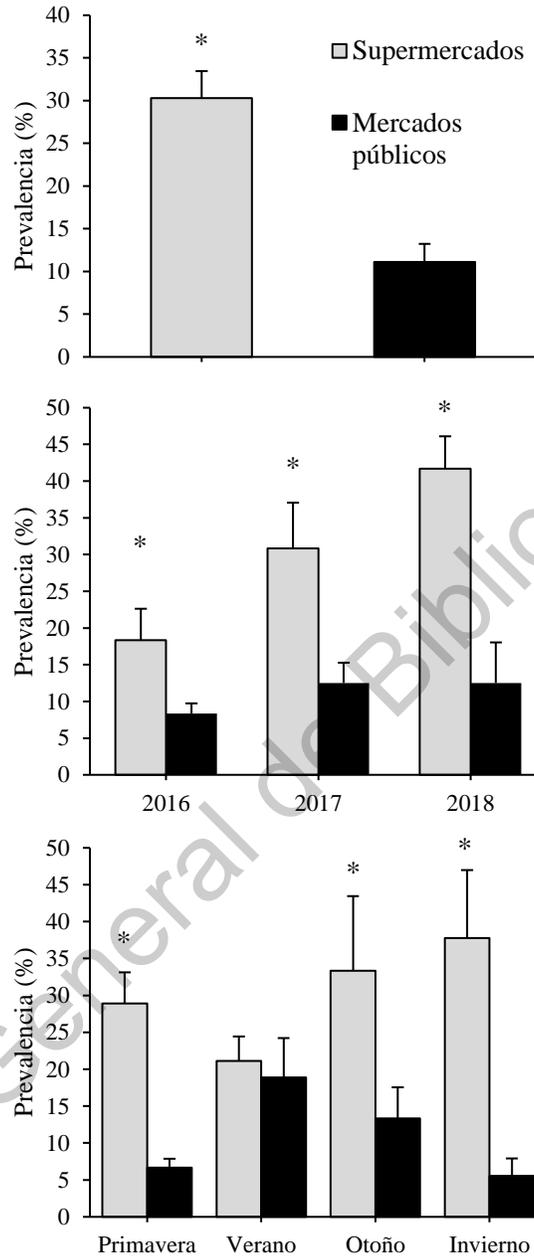


Figura 5.- Prevalencia de *Salmonella* por sitio de muestreo (A), año (B) y estación (C). Los asteriscos muestran diferencia estadística entre supermercados y mercados públicos (Prueba de Chi-cuadrada;  $P < 0.05$ ).