

**USO DE MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) EN LA TIPIFICACION  
MOLECULAR DE *Salmonella* spp. AISLADAS DE LA  
CADENA AVÍCOLA EN EL TOLIMA**

**LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de  
Magister en Ciencias Pecuarias con énfasis en Avicultura**

**Director**

**NOEL VERJAN GARCÍA**

**PH.D. Inmunología**

**Codirector.**

**IANG RONDON BARRAGAN**

**PH.D. Applied Marine Biosciences**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS PECUARIAS**

**IBAGUÉ – TOLIMA**

**2017**

	<b>UNIVERSIDAD DEL TOLIMA</b> <b>FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA</b>	ACTA No. 008
	<b>ACTA SUSTENTACIÓN TESIS DE GRADO</b>	Fecha: 18 de Diciembre de 2017
		Página 1 de 1

### TESIS DE GRADO DIRIGIDA

Siendo las 08:00 horas del día lunes 18 de Diciembre de 2017, se reunieron en la sala de sistemas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, los jurados calificadoros integrados por las doctoras **María del Pilar Sánchez Bonilla** y **Nataly Ruiz Quiñones** por video llamada, el Director de Tesis por video llama doctor **Noel Verjan García**, para dar su concepto sobre la Tesis de Grado, presentada por la estudiante de la Maestría en Ciencias Pecuarias Énfasis en Avicultura **Luz Clemencia Fandiño de Rubio**.

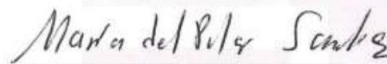
Titulada: "USO DE MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) EN LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp. AISLADAS DE LA CADENA AVÍCOLA EN EL TOLIMA"

Luego de las correcciones y deliberaciones, el jurado asignó la calificación de

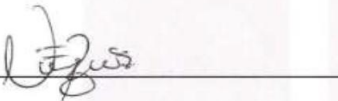
4,9 (cuatro punto nueve)

Para constancia se firma:

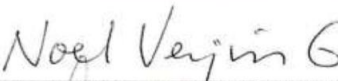
**MARÍA DEL PILAR SÁNCHEZ BONILLA**  
JURADO



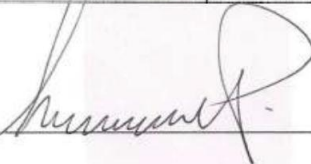
**NATALY RUIZ QUIÑONES**  
JURADO



**NOEL VERJAN GARCÍA**  
DIRECTOR



**LINA MARIA PEÑUELA SIERRA**  
CORDINADORA MAESTRIA



Elaboró: Diana Katherine V.

**A:**

*Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía.*

Mi esposo, por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo, gracias por toda tu ayuda y sacrificio.

Mi familia, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

*Mi abuelita Carmen Ramírez Mejía (QEPD), ahora y siempre mi ángel de la guarda.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Tolima y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por la oportunidad y el apoyo en esta etapa de mi formación académica, todas y cada una de las personas que la integran aportaron al logro de este objetivo de mi vida y ocupan un lugar especial en mi corazón.

Al Doctor Noel Verjan Garcia director de este proyecto por su orientación, apoyo y colaboración a lo largo de esta investigación.

Al Doctor Iang S.Rondón Barragan por su apoyo y ejemplo a seguir en el camino de la investigación.

Al Doctor Rafael Antonio Suárez por su acompañamiento, contribución y colaboración incondicional durante este proceso.

A mis compañeros del Laboratorio Diagnóstico Veterinario, Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología y a los integrantes del grupo de investigación en avicultura especialmente a Mayerly Valderrama y Roy Rodríguez.

A mis amigos: María Alejandra Ribero, Mayerly, y Rafa por estar siempre para mí, muchas gracias.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	15
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
<b>2. DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE <i>Salmonella enterica</i>: UNA REVISIÓN</b> .....	16
2.1 RESUMEN .....	16
2.2 ABSTRACT .....	17
2.3 INTRODUCCIÓN .....	17
2.4 GÉNERO <i>SALMONELLA</i> .....	19
2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>SALMONELLA</i> SPP. ....	21
2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
2.5.2 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	25
2.5.3 Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE).....	27
2.5.4 Multilocus Sequence Typing (MLST).....	27
2.5 CONCLUSIONES .....	31
<b>3. UN TIPO DE SECUENCIA COMÚN (ST) DE <i>Salmonella</i> Enteritidis DE ORIGEN AVIAR Y HUMANOS CON GASTROENTERITIS EN IBAGUÉ, COLOMBIA</b> .....	32
3.1 RESUMEN .....	32
3.2 ABSTRACT .....	33
3.3 INTRODUCCIÓN .....	34
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.4.1 Diseño del estudio.. .....	36

3.4.2	Recolección de las muestras. ....	36
3.4.3	Aislamiento de <i>Salmonella</i> de las muestras de heces humanas. ....	37
3.4.4	Serotificación de los aislados de <i>Salmonella</i> spp.....	37
3.4.5	Test de susceptibilidad antibiótica. ....	37
3.4.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).. ....	38
3.4.7	Multilocus Sequence Typing de aislados de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	39
3.4.8	Análisis Secuencia de nucleótidos.....	40
3.5	RESULTADOS.....	40
3.5.1	Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	40
3.5.2	Serovares de <i>Salmonella</i> spp. ....	40
3.5.3	Test de susceptibilidad a antibióticos.....	41
3.5.4	Multilocus Sequence Typing.. ....	41
3.5.5	Análisis filogenético. ....	43
3.6	DISCUSIÓN.....	44
3.7	CONCLUSIÓN.....	48
3.8	AGRADECIMIENTOS.....	48
4.	<b>PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE <i>Salmonella enterica</i> DE ORIGEN AVIAR Y HUMANO EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.....</b>	<b>50</b>
4.1	RESUMEN.....	50
4.2	ABSTRACT.....	51
4.3	INTRODUCCIÓN.....	51
4.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
4.4.1	Cepas bacterianas.....	55
4.4.2	Aislamiento y Serotificación.....	55
4.4.3	Antibiogramas.....	55
4.5	DISEÑO ESTADÍSTICO.....	57
4.6	RESULTADOS.....	57
4.7	DISCUSIÓN.....	61
4.8	CONCLUSIONES.....	63

<b>5. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>65</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Relación de los serotipos de <i>Salmonella</i> por especies y subespecies según la última revisión del esquema de White-Kauffmann-Le Minor.	18
<b>Tabla 2.</b> Características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR.	22
<b>Tabla 3.</b> Genes del metabolismo bacteriano (Housekeeping) usados como marcadores en la técnica MLST para <i>Salmonella</i> spp.	27
<b>Tabla 4.</b> Serovares y secuencia común (ST) de aislados de <i>Salmonella</i> Enteritidis de origen aviar y humanos con gastroenteritis en Ibagué, Colombia	40
<b>Tabla 5.</b> Criterios para la interpretación de antibiogramas según el método automático BD Phoenix™ panel NMIC/94.	53
<b>Tabla 6.</b> Criterios para la interpretación de antibiogramas en <i>Salmonella enterica</i> según el método manual de difusión de disco en gel de agar Kirby-Bauer.	54
<b>Tabla 7.</b> Serotipos de <i>Salmonella enterica</i> aislada de pacientes con gastroenteritis en la ciudad de Ibagué, Colombia.	55
<b>Tabla 8.</b> Patrones de resistencia a antimicrobianos en <i>Salmonella enterica</i> mediante el método automático BD Phoenix™ NMIC/94.	56
<b>Tabla 9.</b> Patrones de resistencia a antimicrobianos en <i>Salmonella enterica</i> mediante el método manual de difusión de disco en gel de agar Kirby-Bauer.	56
<b>Tabla 10.</b> Distribución de los patrones de resistencia antimicrobiana según origen y serovares de <i>Salmonella enterica</i> .	57



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los pasos más importantes de varias técnicas de tipificación mediante PCR.	21
<b>Figura 2.</b> ADN genómico de los serotipos de <i>Salmonella</i> Enteritidis y Shannon generados por electroforesis en gel de campo pulsado digeridos por la enzima XbaI	24
<b>Figura 3.</b> Análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de los productos de PCR de los siete genes housekeeping de dos cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis de origen aviar.	28
<b>Figura 4.</b> Análisis molecular filogenético de chorismate synthase gen ( <i>aroC</i> ) de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis aisladas de humanos con gastroenteritis, de origen aviar y otras cepas de referencia. La historia evolutiva se dedujo mediante método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei [1]. Se muestra el árbol con la más alta probabilidad de logaritmos (-5805.4149). El árbol está dibujado para escalar, con ramificación, longitudes medidas en el número de sustituciones por sitio. Secuencia de nucleótidos de varias cepas de <i>Salmonella</i> fueron alineados y la imagen del árbol fue construida usando el programa Análisis de Evolución Genética Molecular, MEGA 6 [2]. Los números de acceso son los siguientes: cepa <i>Salmonella enterica</i> FORC_019, CP012396.1; cepa <i>S. Enteritidis</i> OLF-00D989 87-1, CP011942.1; cepa <i>S. Enteritidis</i> SA20094177, CP007468.2; cepa <i>S. Enteritidis</i> EC29121177, CP007333.2; cepa <i>S. Heidelberg</i> SL476, CP001120.1; cepa <i>S. Newport</i> SL254, NC_011080.1; cepa <i>S. Infantis</i> SARB27, NZ_AFYI00000000.1; cepa <i>S. Typhi</i> CT18, AL513382.1; cepa <i>S. Virchow</i> SVQ1, NZ_AZMP00000000.1; cepa <i>S. Dublin</i>	42

3246, CM001151.1; cepa S. Paratyphi A, CP000026.1 ; cepa S. Typhimurium LT2, NC\_003197.1. Los aislados humanos obtenidos de casos clínicos de gastroenteritis y origen aviar en la región del Tolima son aquellos codificados UT S. Enteritidis.

**Figura 5.** Distribución de las cepas de *Salmonella enterica* de granja de ponedora, huevo y humano. 54

## RESUMEN

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis es una de las principales causas de la salmonelosis humana en el mundo, siendo la carne de pollo cruda y los huevos contaminados la principal vía de infección. La identificación de los serovares que circulan en los productos avícolas y su relación con los aislados clínicos ayudará a la implementación de estrategias para mitigar el riesgo. En la región de Tolima, nuestro grupo identificó los principales serovares de *Salmonella* spp., que circula en granjas de gallinas ponedoras, superficie de huevos y en canales crudas de pollo vendidas en Ibagué Tolima, sin embargo, se desconoce actualmente si esos serovares son responsables de infección en humanos. Para empezar a abordar esta problemática este estudio fue diseñado para aislar *Salmonella* spp. de casos clínicos de gastroenteritis y compararlos con aislamientos de diferentes segmentos de la industria avícola del Tolima. Un total de 110 muestras de heces de humanos con gastroenteritis fueron procesadas para el aislamiento de *Salmonella*, sometidas a pruebas de susceptibilidad a antibióticos, seguido de serotipificación y secuenciación de multilocus (MLST) para siete genes de mantenimiento. La prevalencia de *Salmonella* spp. en las heces humanas fue del 9,09% en este estudio y *S. Enteritidis* (n = 4), *S. Typhimurium* (2), *S. Newport* (1), *S. Uganda* (1), *S. Gruposensis* (1) y *S. Braenderup* (1) fueron los principales serotipos presentes en pacientes con gastroenteritis. Nueve aislamientos de *S. Enteritidis* de heces humanas y aves de corral fueron comparados por MLST y los resultados indicaron que un tipo común de secuencia (ST) de *Salmonella* Enteritidis (ST11) está presente en las tres fuentes. ST3172 y ST3233 también se encontraron en granjas de gallinas ponedoras y cáscara de huevo, respectivamente. Finalmente, todos los aislados de *S. Enteritidis* de diferentes fuentes mostraron el mismo patrón resistente a los antibióticos. Se concluye que *S. Enteritidis* ST11 constituye un genotipo común entre el consumo / manipulación de huevos contaminados y la gastroenteritis humana en Ibagué, Tolima Colombia.

**Palabras clave:** *Salmonella*, MLST, serovares, gastroenteritis, transmisión.

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis is a major cause of human salmonellosis worldwide and contaminated eggs and raw chicken meat serve as the principal route of infection. Identification of the serovars circulating in poultry products and their relatedness with clinical isolates will help create awareness in poultry producers and the implementation of strategies to mitigate the risk. In the Tolima region, our group identified the main serovars of *Salmonella* spp. circulating in laying hen farms, surface of eggs and in raw chicken carcasses sold at Ibagué Tolima, however, whether those serovars are responsible for human infection is currently unknown. To begin address this issue, we isolated *Salmonella* spp. from clinical cases of gastroenteritis and compared them to poultry isolates. A total of 110 stool samples were processed for *Salmonella* isolation, antibiotic susceptibility tests, followed by serotyping and Multilocus sequence typing targeting seven housekeeping genes. Prevalence of *Salmonella* spp. in human stools was 9,09 % in this pilot study, and *S. Enteritidis* (n=4), *S. Typhimurium* (2), *S. Newport* (1), *S. Uganda* (1), *S. Gruposensis* (1), and *S. Braenderup* (1) were the main serotypes present in patients with gastroenteritis. Nine isolates of *S. Enteritidis* from human stools and poultry were compared by MLST and the results indicated that a common *Salmonella* Enteritidis sequence type (ST11) was present in all three sources. ST3172 and ST3233 were also found in laying hen farms and egg shell, respectively. Finally, all *S. Enteritidis* from different sources showed the same antibiotic resistant pattern. It is concluded that *S. Enteritidis* ST11 constitutes a link between consumption/manipulation of contaminated eggs and human gastroenteritis in Ibagué, Tolima, Colombia. Additional studies are needed to reveal the association of other *Salmonella* serovars isolated from raw chicken meat and gastroenteritis.

**Keywords:** *Salmonella*, MLST, Serovars, Gastroenteritis, Transmission.

## INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial responsable por 93,8 millones de casos de gastroenteritis por año en todo el mundo (Majowicz et al., 2010). Se caracteriza por un periodo de incubación muy corto de 8 a 72 horas en el humano (FAO & WHO, 2003). La enfermedad es de carácter autolimitante y la sintomatología incluye diarrea, fiebre, vómito, y dolor abdominal y de cabeza (FAO & WHO, 2003).

La enfermedad es causada por una bacteria Gram-negativa del género *Salmonella*, la cual es habitante normal del tracto gastrointestinal de diversas especies animales y transmitida por contaminación de los alimentos de origen animal (contaminación cruzada y re-contaminación) (Carrasco, Morales-Rueda, & García-Gimeno, 2012), entre ellos la carne bovina, porcina y en particular los productos de origen aviar considerados responsables de la gran mayoría de casos de gastroenteritis e infecciones sistémicas (Wray & Wray, 2000). La *Salmonella* es una de las principales causas de enfermedad transmitida por alimentos (ETA); generando morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas en la producción avícola, con mayor impacto en la salud humana (Parra, Durango, & Máttar, 2002). En este sentido es prioritario establecer medidas preventivas en los diferentes segmentos de la cadena avícola, donde el control de la Salmonelosis debe iniciar en las granjas, enfatizando en la aplicación de los protocolos de bioseguridad y buenas prácticas avícolas (BPA) que promuevan la crianza de aves sanas y la garantía de productos inocuos para el consumo humano (Estrad & Valencia, 2012).

La identificación de los distintos serogrupos y serotipos de *Salmonella* ha sido tradicionalmente llevado a cabo a través del uso de antisueros (serotipificación). Sin embargo, el aislamiento microbiológico y la serotipificación consumen tiempo considerable y en algunos casos no es posible establecer dichos serotipos (Terragno, Caffer, Bruna, & Binsztein, 2003).

Estas dificultades han estimulado el desarrollo de técnicas moleculares más precisas para la identificación de *Salmonella* y otros patógenos causantes de enfermedad en humanos, entre ellas tenemos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usada para la amplificación de genes como el de la invasina A (*invA*), la cual permite la identificación del género *Salmonella* en más del 99.4% de las cepas (Rahn, De Grandis, Clarke, McEwen, Galán, et al., 1992) y el secuenciamiento de segmentos de genes asociados al metabolismo bacteriano como la técnica de tipificación basada en secuencias multilocus (MLST), en la cual se amplifican y secuencian siete genes asociados al metabolismo celular de la bacteria que son posteriormente comparados con las secuencias depositadas en las bases de datos, ofreciendo la oportunidad de identificar un tipo de secuencia única en cada especie y de esta manera discriminar con mayor precisión dichos microorganismos (Harbottle, White, McDermott, Walker, & Zhao, 2006; Rahn, De Grandis, Clarke, McEwen, Galán J, et al., 1992).

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y tipificar a nivel de sub especies cepas de *Salmonella* spp. aisladas de humanos con gastroenteritis y de diferentes segmentos de la cadena avícola del departamento del Tolima.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar por métodos microbiológicos especies de *Salmonella* presentes en heces de humanos con gastroenteritis en Ibagué, Tolima, Colombia.
- Identificar los serotipos de *Salmonella* spp., presentes en humanos con gastroenteritis y aquellas circulantes en algunos segmentos de la cadena avícola del departamento del Tolima.
- Tipificar cepas de *Salmonella* spp., de origen humano y aviar aisladas en el departamento del Tolima mediante secuenciamiento (MLST) de algunos genes asociados al metabolismo bacteriano.
- Identificar relaciones filogenéticas de cepas de *Salmonella* de origen aviar frente otras de origen humano y de referencia internacional.
- Determinar la sensibilidad y resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. de origen humano y aviar en el Departamento del Tolima.

## 2. DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella enterica*: UNA REVISIÓN MOLECULAR DIFFERENTIATION OF *Salmonella enterica*: A REVIEW

### 2.1 RESUMEN

El género *Salmonella* agrupa más de 2.600 serovariedades que han sido convencionalmente identificadas mediante técnicas fenotípicas como el aislamiento microbiológico selectivo, pruebas de reacción serológica, perfiles bioquímicos bacterianos y resistencia a antibióticos; no obstante, dicha clasificación taxonómica requiere un alto grado de experticia y la discriminación de los diferentes serovares es aún limitada. Estas desventajas han llevado a generar y aplicar nuevas técnicas moleculares que permiten una clasificación más precisa, específica, sensible y reproducible de los microorganismos. Entre estas técnicas se encuentran el análisis de especies de *Salmonella* por electroforesis en campo pulsado (PFGE) y la tipificación por la técnica de secuencias multilocus (MLST), las cuales analizan en el primer caso los patrones de segmentos de ADN genómico digeridos con enzimas de restricción y en el segundo, las secuencias de nucleótidos obtenidas de la amplificación y secuenciamiento de siete genes involucrados en el metabolismo bacteriano. De esta forma se establece con mayor precisión la identidad de las cepas aisladas y se permiten comparaciones biológicas y filogenéticas y evaluar la historia natural de las enfermedades, su etiología, origen y reservorios, frecuencia de aparición, distribución y los patrones de diseminación existentes entre cepas de distinto origen geográfico. Dichas técnicas moleculares constituyen herramientas epidemiológicas muy útiles para la toma de decisiones que permitan disminuir la frecuencia de las enfermedades en animales y el hombre. Este documento hace una recopilación de las técnicas moleculares usadas en la identificación de especies de *Salmonella* con énfasis en la técnica estándar de oro (PFGE) y la tipificación por secuencias multilocus (MLST), técnicas recientemente implementadas en la tipificación de especies de *Salmonella* circulante en diferentes segmentos de la cadena avícola del Tolima.



Palabras claves: Identificación, *Salmonella*, técnicas moleculares, enfermedades.

## 2.2 ABSTRACT

The genus *Salmonella* groups more than 2,600 serovars that have been conventionally identified by phenotypic techniques such as selective microbiological isolation, serological reaction tests, biochemical profiles, resistance to antibiotics, among others; however, such a taxonomic classification requires a high degree of expertise and discrimination of the different serovars is still limited. These disadvantages have led to generate and apply new molecular techniques that allow a more precise, specific, sensitive and reproducible of the microorganisms. Among these techniques are the analysis of *Salmonella* species by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST), which in the first case analyze the patterns of genomic DNA segments digested with restriction enzymes and in the second, the nucleotide sequences obtained from the amplification and sequencing of seven genes involved in the bacterial metabolism. In this way, precisely established and biological comparisons phylogenetic to know the natural history of diseases, its etiology, origin and reservoirs, frequency of occurrence, distribution and patterns of dissemination existents among strains of different geographic origin. These molecular techniques are very useful epidemiological tools for making decisions that can reduce the frequency of diseases in man and animals paper compiles the molecular techniques used in the identification of *Salmonella* species with emphasis on standard gold technique (PFGE) and (MLST); techniques recently implemented in the identification of *Salmonella* species circulating in different segments of the Tolima's poultry industry.

Keywords: Identification, *Salmonella*, molecular techniques, diseases.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

Salmonelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por subespecies de *Salmonella enterica*, la cual es transmitida de los animales al hombre

(Gutiérrez, Paasch, & Calderón, 2008) a través del consumo de alimentos cárnicos y sus derivados contaminados (Arguello et al., 2013; Atyabi, Zahraei, Ghazisaeedi, & Ashrafi, 2012; Caffer & Pichel, 2006), por prácticas higiénicas pobres y/o el incorrecto almacenamiento (Carrasco et al., 2012; Estrada & Valencia, 2012). Siendo los productos de origen aviar como el pollo (Adelantado et al., 2008; EFSA, 2010; Rasschaert, Houf, & L., 2007) y los huevos (FAO/OMS., 2002; Keller, Benson, Krotec, & Eckroade, 1995; Parra, Durango, & Máttar, 2002) la principal vía de transmisión de enfermedad al humano. (Castañeda, 2016; Rodríguez, Rondón, & Verjan, 2015).

Salmonelosis es responsable de 93,8 millones de casos de gastroenteritis por año en todo el mundo (Majowicz et al., 2010). En la unión Europea se notificaron 140 brotes de ETA causados por *Salmonella* en el 2010 (EFSA-France, 2010; EFSA-Germany, 2010; EFSA-Ireland, 2010; EFSA-Sweden, 2010; EFSA-United Kingdom, 2010). En América Latina y el Caribe en el mismo año se reportaron 6511 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) por salmonelosis en 22 países (EFSA-France, 2010). Durante 2011, FoodNet identificó un total de 18.964 casos de *Salmonella* confirmados por laboratorios en EEUU, los serotipos más frecuentes fueron *S. Enteritidis* (18%), *S. Typhimurium* (13%) y *S. Newport* (12%) (EFSA-United Kingdom, 2010). En Colombia el sistema de vigilancia y control de los eventos de ETA reportan que a partir del 2008 hubo un incremento significativo en aislamientos de *Salmonella* sp. pasando de 483 aislamientos en el año 2008 a 1078 en el 2013 con una tasa de crecimiento del 123% durante este periodo, donde las cifras más altas de aislamientos se evidenciaron en el departamento de Antioquia (32,12%) y la ciudad de Bogotá (29,66%). El departamento del Tolima ocupó el puesto 15 con el 0,86%; predominando los serotipos *S. Typhimurium* (32,80%), *S. Enteritidis* (28,88%) y *S. Typhi* con el 8,70% (INS, 2013). Las razones del incremento registrado en aislamientos de *Salmonella* spp., a partir del 2008 en las principales urbes de Colombia es actualmente desconocido, por una parte podría ser debido a la implementación de técnicas de identificación más sensibles y rápidas en dichas regiones o por el contrario a un aumento en la notificación y reporte de casos sospechosos de la infección o enfermedad. Por otro lado, la baja tasa de aislamiento de *Salmonella* en el departamento del Tolima, se debe en gran parte a la ausencia de

notificación y reporte de los brotes sospechosos de enfermedad a los centros de salud, insuficiencia de los centros de salud, ausencia de servicios de diagnósticos apropiados y resistencia cultural de los usuarios para acceder a servicios de salud debido a costos.

La salmonelosis en el humano se caracteriza por gastroenteritis aguda e infecciones sistémicas (EFSA, 2011; Wray & Wray, 2000), con un periodo de incubación muy corto de 8 a 72 horas (FAO & WHO, 2003). La sintomatología incluye diarrea, fiebre, vómito, dolor abdominal y cefalea (FAO & WHO, 2003). La pérdida del equilibrio en la relación patógeno, ambiente y hospedero genera condiciones apropiadas para el desarrollo de cuadros severos y letales (Vásquez, Sierra, & López, 2011). Adicionalmente, el uso indiscriminado de antibióticos en la producción primaria ha generado un incremento de cepas resistentes (Álvarez E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, 2012), lo cual compromete la efectividad de los tratamientos y prolonga la enfermedad en pacientes inmuno-comprometidos.

#### **2.4 GÉNERO *SALMONELLA*.**

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Flores & Escolástica, 2002). Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, de 0,7 - 1,5 x 2,0 – 5 µm, generalmente móviles por flagelos peritricos, con excepción de la serovariedad Gallinarum - Pollorum (Brunia, 2008). Son anaerobios facultativos y no esporulados (Caffer, Terragno & Binsztein, 2008; Sastre, Sastre, Tortuero, Suárez & López, 2002). Son microorganismos sensibles a procesos de pasteurización y viable a temperaturas de congelación (Jay, J., Loessner & Golden, 2005). La estructura antigénica está conformada por antígenos somático (O), flagelar (H) y de envoltura (Vi) (Shi, Singh, Ranieri, Wiedmann, & Moreno Switt, 2013; World Health Organization & Pasteur Institut, 2007). El antígeno O están compuesto por complejos de fosfolípidos, polisacáridos y hexosaminas con características termoestables (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2009). Los Antígenos Flagelares H son proteicos y termolábiles constituido por flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado, con serovariedades monofásicas y bifásicas (Bayley y Schott, 1982; Parra

et al., 2002), y el antígeno capsular Vi, es un polisacárido constituido por ácido N-acetil glucosamina- ácido-urónico, y se encuentra en las serovariedades *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. Dublin* (Caffer et al., 2008; Flores & Escolástica, 2002).

El género *Salmonella* es de difícil taxonomía, la nomenclatura recomendada por la OMS (Brenner, Villar, Angulo, Tauxe, & Swaminathan, 2000), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y por la Sociedad Americana para la Microbiología (ASM) (Martínez-ballesteros et al., 2012), es a través del esquema de serotipificación White-Kauffmann-Le Minor (Guibourdenche & Roggentin, 2010), el cual determina la fórmula antigénica clasificándolo en serovares (Popoff & Le Minor, 2001). Clásicamente se distinguen 2 especies: *Salmonella enterica* con 6 subespecies y *Salmonella bongori* con una (1) subespecie (Coburn, Grassl, & Finlay, 2007; Ellermeier & Schlauch, 2006). *Salmonella enterica* actualmente agrupa alrededor de 2610 serovariedades (Brankatschk, Blom, Goesmann, Smits, & Duffy, 2012), definidas en función de las diferentes asociaciones de factores antigénicos O, H y Vi (Caffer et al., 2008; Pachon, 2009) (Farmer, 2003; Stanchi, 2007; Terragno et al., 2003; World Health Organization & Pasteur Institut, 2007). Es importante destacar que la *Salmonella enterica* de la subespecie enterica es el grupo clínicamente más significativo (Tabla 1) responsable del 99 % de los casos de salmonelosis (Hadjinicolaou, Demetriou, Emmanuel, Kakoyiannis, & Kostrikis, 2009; Shi et al., 2013).

**Tabla 1.** Relación de los serotipos de *Salmonella* por especies y subespecies según la última revisión del esquema de White-Kauffmann-Le Minor.

<b>Especie</b>	<b>Subespecie</b>	<b>Serotipos</b>	<b>Distribución</b>
<b><i>Salmonella enterica</i></b>		2.587	
	Subsp. <i>enterica</i> (I)	1.547	Humanos y Animales de sangre caliente
	Subsp. <i>salamae</i> (II)	513	Animales de sangre fría y del ambiente.
	Subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	100	Animales de sangre fría y del ambiente.

<b>Especie</b>	<b>Subespecie</b>	<b>Serotipos</b>	<b>Distribución</b>
	Subsp. <i>diaizonae</i> (IIIb)	341	Animales de sangre fría y del ambiente.
	Subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y del ambiente.
	Subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y del ambiente.
<b><i>Salmonella bongori</i></b>	V	23	No constituye un patógeno para los humanos, pero si ha sido implicada en ciertas patologías en animales.
<b>TOTAL</b>		2.610	

Fuente: (Guibourdenche & Roggentin, 2010).

Para la serotipificación de *Salmonella* tradicionalmente se requiere de un laboratorio especializado de referencia, donde es necesario contar con más de 250 antisueros diferentes, así como 350 diferentes antígenos para la preparación y el control de calidad de los antisueros (Fitzgerald, Sherwood, Gheesling, Brenner, & Fields, 2003; McQuiston et al., 2004; Shi et al., 2013). Desde el punto de vista epidemiológico la *Salmonella* se pueden clasificar en tres grupos: Las *Salmonella* spp. adaptadas a vivir en el ser humano (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *C*), que se transmiten en forma directa o indirecta entre personas; las adaptadas a una determinada especie animal y rara vez causan enfermedad en el hombre (*S. Abortus ovis*, en ovinos; *S. Abortus equi*, en equinos y *S. Gallinarum*, en aves); las *Salmonella* spp. que no poseen adaptación específica de hospedero, infectan tanto al hombre como a distintas especies de animales, en este grupo se encuentran todos los serotipos de *Salmonella enterica* causantes de zoonosis, con 2610 serovariedades de amplia distribución en la naturaleza (Stanchi, 2007; Terragno et al., 2003).

## 2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *SALMONELLA* SPP.

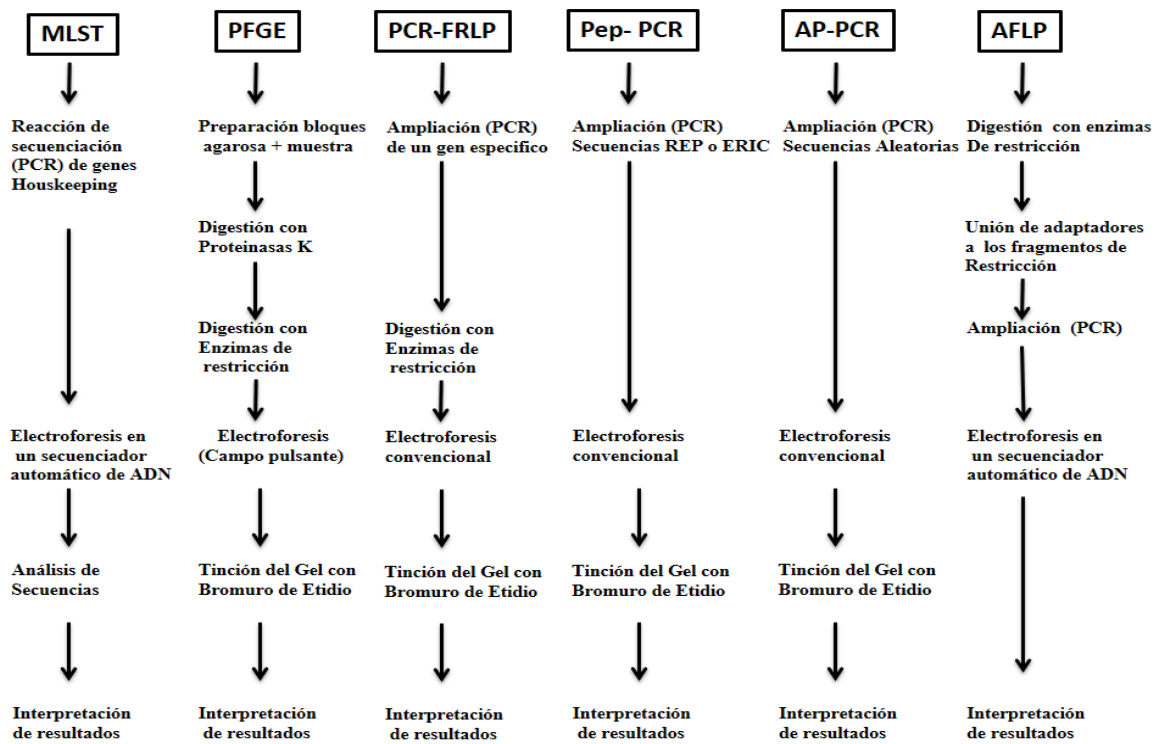
Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) como los biotipos, serotipos, lisotipos, bacteriocinotipos, antibiotipos (Flores, 2003) y genotípicos (basados en el estudio del ADN) como la presencia de plásmidos, perfiles de restricción de ADN cromosómico con electroforesis en campo pulsado (PFGE), ribotipos, tipos de secuencia de inserción (IS200), perfiles de amplificación de ADN cromosómico (RAPD), amplificación específica a partir de secuencias repetitivas (ERIC PCR ribotipia,) y el polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP) de secuencias repetitivas y no repetitivas (Fernández-Cuenca, 2004; Flores, 2003; Millemann, 1998; Parker, Asokan, & Carlson, 1999).

La identificación de los distintos serogrupos y serotipos de *Salmonella* ha sido tradicionalmente llevado a cabo a través del uso de antisueros (serotipificación), no obstante el aislamiento microbiológico y la serotipificación consumen tiempo considerable y han mostrado limitaciones y en algunos casos han sido incapaces de establecer dichos serotipos (Terragno et al., 2003). Estas dificultades han estimulado el desarrollo de técnicas moleculares más precisas para la identificación de *Salmonella*. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de genes como el de la invasina A (*invA*), permite la identificación del género *Salmonella* en más del 99.4% de las cepas (Rahn, De Grandis, Clarke, McEwen, Galán, et al., 1992). Por otro lado, el secuenciamiento de segmentos de siete genes asociados al metabolismo celular llevado a cabo con la técnica de tipificación basada en secuencias multilocus (MLST), permite la comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos, ofreciendo la oportunidad de identificar un tipo de secuencia única en cada especie y de esta manera discriminar con mayor precisión dichos microorganismos (Harbottle et al., 2006; Rahn, De Grandis, Clarke, McEwen, Galán J, et al., 1992).

Las técnicas moleculares actuales disponibles para genotipificación de *Salmonella* pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: a) las relacionadas con la amplificación de fragmentos de DNA por PCR, b) aquellas en las cuales se obtienen perfiles mediante la hibridación de ácidos nucleicos, c) las basadas en el estudio de un segmento del genoma o del genoma completo mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE), y d)

las que involucran la secuenciación parcial o total del genoma de los microorganismos (Glenda Vílchez & Alonso, 2009). No obstante, la pertinencia y la efectividad de un método de tipificación deberá ser evaluada mediante los criterios de capacidad de identificación, reproducibilidad, estabilidad, poder discriminatorio, concordancia epidemiológica y eficacia (Labarca, 2002). Las principales técnicas moleculares usadas en la caracterización de *Salmonella* se describen en la figura 1.

**Figura 1.** Representación esquemática de los pasos más importantes de varias técnicas de tipificación mediante PCR.



Fuente: Adaptada de (Fernández-Cuenca, 2004; Olive & Bean, 1999).

**2.5.1** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los últimos años las técnicas basadas en reacciones de amplificación de ADN como el PCR han sido ampliamente utilizadas para la tipificación del genoma bacteriano (Foxman, Zhang, Koopman, Manning, & Marrs, 2005b), las cuales involucran la amplificación de genes o de secuencias de DNA polimórficas. En general existen diversas variantes de la tipificación por PCR que han sido aplicadas con fines epidemiológicos: 1) Aquellas en las que se

usan cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes separados por una distancia no superior a la que la Taq polimerasa puede amplificar. 2) Variantes en las que el genoma o producto amplificado se somete a digestión con enzimas de restricción, y 3) Aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación (Díaz, 2015), REA (Restriction Enzyme Analysis), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction) (Cardozo-Bernal, Ramón, Poutou-Piñales, Carrascal-Camacho, & Zambrano, 2013). Una de las primeras técnicas de PCR descritas y estudiadas en *Salmonella* y *Escherichia coli* fueron REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindrome) o PU-PCR (Palindromic Unit) y para Enterobacterias ERIC-PCR, también conocidas como IRU (Intergen) (Cercenado & Cantón, 2008).

Las secuencias ERIC constan de 126 pb, con un repetido invertido central conservado, mientras que las secuencias REP son elementos palindrómicos de 21-65 pb. (Fournier, Drancourt, & Raoult, 2007; Tobes & Pareja, 2006). El polimorfismo generado dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias REP o ERIC dentro del genoma (G. Vílchez & Alonso, 2009).

PCR es un método menos laborioso, más rápido, económico, fácil de analizar, de excelente reproducibilidad y más flexible que el PFGE, facilitando el procesamiento de un mayor número de muestras y prescindiendo del cultivo de los microorganismos (Fernández, Vílchez & Alonso, 2009), sin embargo, permiten analizar sólo un sector reducido del genoma del microorganismo. Por otra parte, a pesar de poseer un elevado poder discriminatorio, muestran mayor efectividad para diferenciar cepas no relacionadas clonalmente que, para establecer distinciones entre cepas relacionadas filogenéticamente. Por esta razón, se consideran que, en comparación con el PFGE, presentan un menor poder de discriminación (Fernández-Cuenca, 2004; G. Vílchez & Alonso, 2009), en la tabla 2 se recopilan las características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR.



**Tabla 2.** Características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR.

MÉTODO	SIGLA	Facilidad de la técnica	Interpretación de resultados	Duración de la técnica (días)	Reproducibilidad entre laboratorios	Costo de la prueba
Multilocus Sequence Typing	MLST	Difícil	Fácil	3	Excelente	Elevado
Multilocus Enzyme Electrophoresis	MLEE	Difícil	Moderado	2	Buena	Elevado
Pulsed-Field Gel Electrophoresis	PFGE	Moderado	Moderado	3	Excelente	Moderado
Restricción Fragment Length Polymorphis	PCR-RFLP	Fácil	Fácil	1	Buena	Bajo
Múltiplex Polymerase Chain Reaction	PCR-Mult	Fácil	Fácil	1	Buena	Moderado
Anplified Fragment Length Polymorphism	AFLP	Regular	Moderado	2	Buena	Moderado
Repetitive Element Sequence-based	rep-PCR	Fácil	Fácil	1	Buena	Bajo

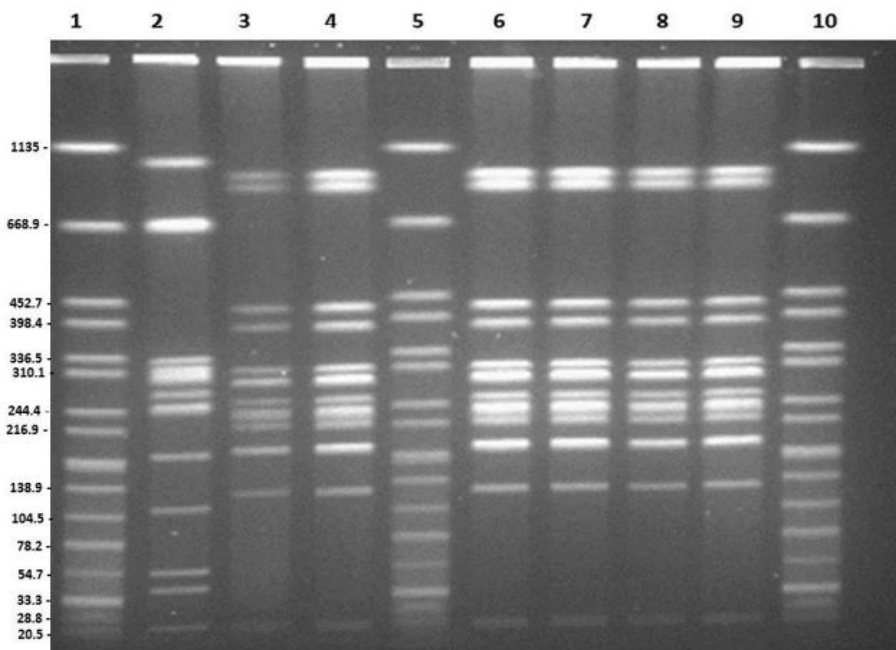
Fuente: Adaptado de (Fernández-Cuenca, 2004; Fredriksson-Ahomaa, Stolle, & Korkeala, 2006; Olive & Bean, 1999; Viridi & Sachdeva, 2005).

**2.5.2** Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). El término original Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) fue utilizada por Schwartz & Cantor, (1984); es una técnica que permite la separación de fragmentos de ADN de alto peso molecular en geles de agarosa bajo la influencia de campos eléctricos múltiples y alternos (pulsos) (Nassonova, 2008). Esta técnica es utilizada para la detección temprana, el rastreo y la investigación de los brotes de origen alimentario, (Aarnisalo et al., 2003; Kérouanton et al., 2010). La técnica permite el uso de enzimas de restricción que cortan con baja frecuencia el DNA genómico bacteriano y por tanto producen perfiles simples (10 a 20 bandas), lo que facilita el análisis y la comparación de los resultados (Graves & Swaminathan, 2001).

Según Lukinmaa y colaboradores en el 2004 y Mammina y colaboradores en el 2009, la discriminación de PFGE fue mayor a la de serotipificación y la ribotipificación. Sin embargo, pese a conocerse que métodos como el MLVA (Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis) y el MLST presentan mayor poder de discriminación que la PFGE sigue siendo la PFGE el método más utilizado para la diferenciación molecular de patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes*, entre otros (Miya et al., 2008; Revazishvili et al., 2004). PFGE ha permitido la identificación y rastreo de fuentes de contaminación con un número de

microorganismos en individuos de diferentes regiones geográficas, entre ellas, infecciones por *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium proveniente de leche de vaca no pasteurizada (Lind et al., 2007). Nuestro grupo de investigación en sanidad aviar de la Universidad del Tolima ha implementado PFGE en la caracterización molecular de cepas de *Salmonella* spp., aisladas de granjas de gallinas ponedoras de la región, donde al menos tres patrones diferentes de macrorestricción por la enzima *Xba*I fueron reportados (Rodríguez, 2015). Notable, *Salmonella* Enteritidis mostró un patrón único, mientras que los aislamientos de *Salmonella* Shannon se agruparon en dos patrones distintos (Figura 2).

**Figura 2.** ADN genómico de los serotipos de *Salmonella* Enteritidis y *S.* Shannon generados por electroforesis en gel de campo pulsado digeridos por la enzima *Xba*I.



Fuente: (Rodríguez, 2015). El carril 1,5 y 10 corresponden al patrón de la cepa de referencia *Salmonella* Braenderup H9812, el carril 2 a *S.* Enteritidis aislados de cascara de huevo y los carriles 3,4,6,7,8 y 9 a patrones de *S.* Shannon aislados de alimento balanceado y muestras ambientales provenientes de granjas de gallinas ponedoras en el departamento del Tolima (Rodríguez, 2015).

**2.5.3 Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE).** El Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) difiere de otros métodos moleculares de tipificación, al ser un método fenotípico y no genotípico que examina la variación en la movilidad electroforética de enzimas solubles de los microorganismos (Selander et al., 1986). MLEE analiza la movilidad electroforética de las enzimas del metabolismo propias del agente (house-keeping) visualizadas en geles de almidón donde se comparan las diferentes variantes de cada enzima según los alelos en el locus genético. Un número bajo de variantes son detectadas en los locus, por lo cual para obtener un alto nivel de resolución se requiere el análisis de 20 o más loci. Los alelos en cada locus definen un tipo de lectura de electroforesis y la relación entre los aislamientos se visualiza mediante dendogramas producidos a partir de diferencias por pares entre los tipos electroforéticos, esta técnica ha demostrado ser eficaz en la caracterización de clones dentro las poblaciones bacteriana asociadas (Enright & Spratt, 1999; Jordan & Dalmasso, 2015; McQuiston et al., 2008).

Un análisis por MLEE de 96 cepas de *Salmonella* distinguió 80 tipos electroforéticos (ETS) y los agrupó en ocho grupos distintos, siete de los cuales correspondieron exactamente a siete grupos taxonómicos (I, II, IIIa, IIIb, IV, V, y VI) definidos previamente sobre la base del biotipo y de la hibridación de ADN genómico (Boyd, Wang, Whittam, & Selander, 1996). MLEE aunque puede tener una buena reproducibilidad (Blackall et al., 1999), no es una técnica que se adapte laboratorios de rutina (Blackall, Miflin, Miflin, Blackall, & Miflin, 2000).

**2.5.4 Multilocus Sequence Typing (MLST).** La Multilocus Sequence Typing (MLST) para la tipificación de múltiples loci (Wattiau, Boland, & Bertrand, 2011) adaptó los conceptos de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y permitió establecer que los alelos en cada locus se definieran directamente mediante la secuenciación de nucleótidos, en lugar de la medición indirecta de la movilidad electroforética de sus productos génicos (Meiden & Aanensen, 2007).

La MLST se basa en el análisis de la secuencia de uno o varios loci genéticos, mediante el uso de pruebas de PCR, permitiendo la obtención de amplicones de ADN, a partir de la muestra biológica (Ghaderi, Tadayon, Khaki, & Mosavari, 2015). Los productos de PCR secuenciados son recibidos en formato de cromatograma, y para su análisis se requiere de programas bioinformáticos como: Chromas Lite Ver. 2.6 para evaluar las secuencias (Technelysium, 2016), Clustal X Ver.2.0.11 para alinear los segmentos y comparar sus nucleótidos (Larkin et al., 2007), y Artemis como un visor de secuencias de ADN y herramienta de anotación que permite la visualización de las características de la secuencia y los resultados de los análisis dentro del contexto de la secuencia (Rutherford, Parkhill, Crook, Horsnell, & Rice, 2000). MLST posee una alta reproducibilidad y fácil estandarización realizando comparaciones entre diferentes aislados mostrando una mayor potencialidad para determinar las relaciones filogenéticas entre cepas (M. Maiden et al., 1998; Zaidi, Konstantinou, & Zervos, 2003).

La MLST en comparación con otras técnicas de tipificación de cepas, tiene muchas ventajas; por ejemplo, es consistente, reproducible, y combina la secuenciación y bioinformática con un enfoque genético en poblaciones para producir resultados precisos y fiables (Chang et al., 2015). El conocimiento de las secuencias completas del genoma de microorganismos contribuyó a la selección apropiada de las regiones polimórficas, mejorando el alcance y su capacidad de discriminación (Foxman, Zhang, Koopman, Manning, & Marrs, 2005a; G. Vílchez & Alonso, 2009; Zaidi et al., 2003).

En la MSLT se comparan regiones polimórficas de genes cuyos productos se encuentran involucrados en funciones esenciales del microorganismo: a) las cepas que muestren perfiles alélicos idénticos, pueden considerarse como representantes de un mismo clon; b) los genes o segmentos de éstos que presenten diferencias en la secuencia de nucleótidos, pueden ser considerados alelos distintos y; c) con base en el análisis de todos los genes esenciales, se puede elaborar un perfil alélico para cada cepa (Foxman et al., 2005a; G. Vílchez & Alonso, 2009; Zaidi et al., 2003).

La técnica de MLST específica para *Salmonella* fue desarrollada inicialmente para el análisis de serovar Typhi (Kidgell et al., 2002) y posteriormente se probó con 110 aislamientos de 25 serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica* (Torpdahl, Skov, Sandvang, & Baggesen, 2005). La técnica emplea siete genes involucrados en el metabolismo bacteriano (house-keeping) Tabla 3.

**Tabla 3.** Genes del metabolismo bacteriano (Housekeeping) usados como marcadores en la técnica MLST para *Salmonella* spp.

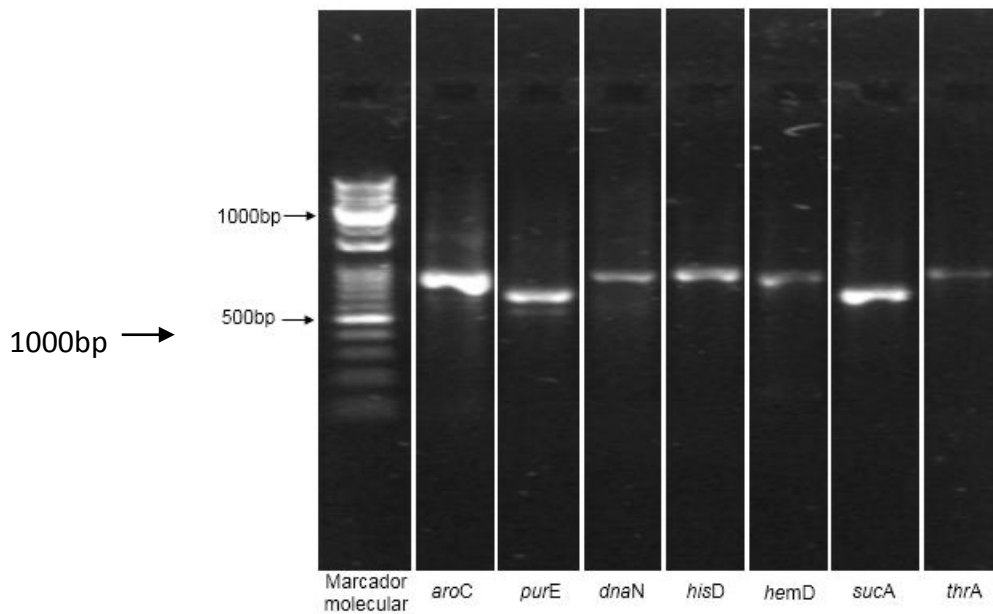
Genes housekeeping	Primers	Longitud	Descripción
<i>aroC</i>	F 5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3' R 5'-CCACACACGGATCGTGGCG-3'	826 bp	Corismate sintasa
<i>dnaN</i>	F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3' R 5'-AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC-3'	833 bp	Subunidad beta III de la ADN polimerasa
<i>hemD</i>	F1 5'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3' R 5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	666 bp	Cosintasa de uroporfirinogeno III
<i>hisD</i>	F1 5'-GAAACGTTCCATTCCGCGC-3' R1 5'-GCGGATTCGGGCGACCAG-3'	894 bp	Histidinol deshidrogenasa
<i>purE</i>	F1 5'-GACACCTCAAAAGCAGCGT-3' R2 5'-AGACGGCGATACCCAGCGG-3'	510 bp	Fosforibosilaminoimidazole carboxilasa
<i>sucA</i>	F1 5'-CGCGCTCAAAACAGACCTAC-3' R1 5'-GACGTGGAAAATCGGCGCC-3'	643 bp	Alfa cetoglutarato deshidrogenasa
<i>thrA</i>	F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3' R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	852 bp	Aspartokinasa $\beta$ homoserina deshidrogenasa

Adaptada de: (Achtman, Timer, & Velayudhan, 2013; Ghaderi et al., 2015; Singh, Foley, Nayak, & Kwon, 2012).

En el marco del proyecto “Tipificación por Secuencias Multilocus (MLST) de *Salmonella* spp. Aislada de la Cadena Avícola en el Tolima”, se aplicó el protocolo descrito por Achtman et al., (2012) y Liu, Liu, Zhu, Yu, & Shi, (2011) a nueve cepas de *Salmonella* Enteritidis (9,12; 9, m; - Grupo D1); donde, el ADN bacteriano fue extraído a través de un kit comercial, utilizando los primers (tabla 3) y condiciones de PCR descritas en (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>), amplificando siete genes: *aroC*, *purE*, *dnaN*, *sucA*, *thrA*, *hemD* y *hisD* (Kidgell et al., 2002).; visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 3).

MLST en *Salmonella* fue utilizada en la tipificación de 4.257 aislamientos que comprendían 554 serotipos, como resultados se obtuvieron 1092 tipos de secuencia; los aislados que poseen alelos idénticos para todos los fragmentos de genes son asignados a un tipo de secuencia común (ST) o comunes (STS) (M. Achtman et al., 2012). La mayoría de los aislados y muchos ST se agruparon en 138 grupos genéticamente muy relacionados llamados eBurstGroups (eBGs), y tribus que comparten todos menos uno o dos alelos, que se agrupan en complejos clonales basados en ST (Cooper & Feil, 2004), sobre la base de eBURST (Turner & Feil, 2007), Muchos eBGs corresponden a un serotipo, por ejemplo Typhimurium en eBG1, en el caso de Enteritidis, la mayoría están en eBG4 y muchos eBGs pueden contener más de un serotipo (M. Achtman et al., 2012). La información y las secuencias obtenidas a través de MLST están disponibles al público y se pueden acceder a través de los siguientes links: <http://pubmlst.org/databases.shtml> y <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>. (M. Achtman et al., 2012; Ghaderi et al., 2015).

**Figura 3.** Análisis electroforético en geles de agarosa al 2% de los productos de PCR de los siete genes housekeeping de dos cepas de *Salmonella* Enteritidis de origen aviar.



Fuente: Autor

## 2.5 CONCLUSIONES

*Salmonella enterica* es una especie bacteriana que agrupa más de 2.500 serovariedades, entre las cuales están incluidos un número de patógenos de gran importancia en animales y humanos. La variedad en serogrupos en *Salmonella enterica* son diferenciados tradicionalmente a través del aislamiento microbiológico selectivo, pruebas bioquímicas y pruebas de reacción serológica; no obstante, dicha clasificación taxonómica requiere de personal calificado, un amplio panel de antisueros y cepas de referencia y la discriminación de los diferentes serovares es aún limitada. Por otro lado, las técnicas moleculares permiten una clasificación más precisa, específica, sensible y reproducible de los microorganismos con limitados recursos humanos y de infraestructura. El uso de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el análisis de especies de *Salmonella*., y la tipificación por la técnica de secuencias multilocus (MLST), constituyen dos herramientas de tipificación molecular que permiten establecer con mayor precisión la identidad, origen y distribución de los microorganismos y su implementación en investigación y diagnóstico de rutina permitiría la toma de decisiones más precisas y la implementación de medidas apropiadas para prevenir la diseminación de las enfermedades en animales y el hombre. MLST se ha convertido en un elemento esencial en los análisis epidemiológicos, cubriendo las limitaciones de las técnicas fenotípicas, complementando las estrategias utilizadas para combatir la dispersión de las enfermedades infecciosas, permitiendo el análisis de la persistencia de algunas cepas, el análisis de riesgo, así como el seguimiento y correlación de los aislamiento entre la fuente y el paciente, facilitando la interpretación epidemiológica en salud pública para el control de las infecciones por *Salmonella*.

### **3. UN TIPO DE SECUENCIA COMÚN (ST) DE *Salmonella* Enteritidis DE ORIGEN AVIAR Y HUMANOS CON GASTROENTERITIS EN IBAGUÉ, COLOMBIA A COMMON *Salmonella* Enteritidis SEQUENCE TYPE FROM POULTRY AND HUMAN GASTROENTERITIS IN IBAGUE, COLOMBIA**

#### **3.1 RESUMEN**

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis es una de las principales causas de la salmonelosis humana en todo el mundo y los huevos contaminados y la carne de pollo cruda son las principales fuentes de infección. La identificación de los serovares circulantes en los productos de origen aviar y su relación con aislados clínicos ayudarán a crear conciencia en los productores avícolas y la implementación de estrategias para mitigar el riesgo. En la región del Tolima, nuestro grupo identificó el principal serovar de *Salmonella* spp., circulando en granjas de gallinas ponedoras, superficie de los huevos y canal de pollo comercializado en Ibagué Tolima, sin embargo, se desconoce actualmente si esos serovares son responsables de infecciones en humanos. Para empezar a abordar éste tema, nosotros aislamos *Salmonella* spp., de casos clínicos de gastroenteritis y estos se compararon con aislamientos de granjas y productos de origen aviar. Un total de 110 de muestras de heces fueron procesadas para el aislamiento de *Salmonella*, test de sensibilidad a antibióticos, seguido de serotipificación y secuenciación por medio de Multilocus Sequence Typing (MLST) de 7 genes house - keeping. La prevalencia de *Salmonella* spp., en heces humanas fue de 9,09% en éste estudio piloto, y *S. Enteritidis* (n=4), *S. Typhymurium* (2), *S. Newport* (1), *S. Grupensis* (1), *S. Uganda* (1) y *S. Braenderup* (1) fueron los principales serotipos presentes en pacientes con gastroenteritis. Nueve aislados de *S. Enteritidis* de heces humanas y origen aviar fueron comparadas por medio de MLST y los resultados indicaron que un tipo de secuencia común (ST11) de *Salmonella* Enteritidis estuvo presente en todas las tres fuentes. ST3172 y ST3233 fueron también encontradas en las granjas de gallinas ponedoras y cáscara de huevo, respectivamente. Finalmente, todas las *S. Enteritidis* de las diferentes fuentes mostraron el mismo patrón de resistencia antibiótica. Esto concluye



que *S. Enteritidis* ST11 constituye un vínculo entre el consumo/manipulación de huevos contaminados y gastroenteritis humana en Ibagué, Colombia. Adicionalmente son necesarios estudios complementarios para establecer la asociación de los otros serovares de *Salmonella* aislados de carne de pollo cruda y gastroenteritis humana.

**Palabras clave:** *Salmonella*, MLST, Serovares, Gastroenteritis, Transmisión

### 3.2 ABSTRACT

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis is a major cause of human salmonellosis worldwide and contaminated eggs and raw chicken meat serve as the principal route of infection. Identification of the serovars circulating in poultry products and their relatedness with clinical isolates will help create awareness in poultry producers and the implementation of strategies to mitigate the risk. In the Tolima region, our group identified the main serovar of *Salmonella* spp., circulating in laying hen farms, surface of eggs and in raw chicken carcasses sold at Ibagué Tolima, however, whether those serovars are responsible for human infection is currently unknown. To begin address this issue, we isolated *Salmonella* spp., from clinical cases of gastroenteritis and compared them to poultry isolates. A total of 110 stool samples were processed for *Salmonella* isolation, antibiotic susceptibility tests, followed by serotyping and Multilocus Sequence Typing targeting seven house-keeping genes. The prevalence of *Salmonella* spp, in human stools was 9,09 % in this pilot study, and *S. Enteritidis* (n=4), *S. Typhimurium* (2), *S. Newport* (1), *S. Uganda* (1), *S. Gruposensis* (1), and *S. Braenderup* (1) were the main serotypes present in patients with gastroenteritis. Nine isolates of *S. Enteritidis* from human stools and poultry were compared by MLST and the results indicated that a common *Salmonella* Enteritidis sequence type (ST11) was present in all three sources. ST3172 and ST3233 were also found in laying hen farms and egg shell, respectively. Finally, all *S. Enteritidis* from different sources showed the same antibiotic resistant pattern. It is concluded that *S. Enteritidis* ST11 constitutes a link between consumption/manipulation of contaminated eggs and human gastroenteritis in Ibagué, Colombia. Additional studies are needed to reveal the association of other *Salmonella* serovars isolated from raw chicken meat and gastroenteritis.

Keywords: Gastroenteritis, MLST, *Salmonella*, Serovars, Transmission.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

La Salmonelosis es una enfermedad transmitida por el consumo de alimentos, ampliamente distribuida y causada por subespecies del grupo I de *Salmonella enterica*. Subespecies I agrupa más de 1547 serovares patogénicos para humanos y animales (Grimont & Weill, 2007; Sanderson & Nair, 2013). Las *Salmonellas* no tifoideas (NTS) usualmente causan gastroenteritis auto-limitada donde se desarrollan síntomas espontáneos que mejoran sin ninguna intervención especial, y bajo ciertas condiciones ellas pueden causar infecciones extra-intestinales invasivas (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin* y *S. Heidelberg*, entre otras), mientras *Salmonella* tifoidea (*S. Typhi* y *S. Paratyphi A, B y C*) causa fiebre entérica (Langridge, Wain, & Nair, 2013). Las infecciones puede convertirse en una enfermedad potencialmente mortal cuando llega al torrente sanguíneo, particularmente en niños menores de tres años, ancianos y personas inmunocomprometidas (Mercado et al., 2012). *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son responsables de la mayoría de casos clínicos de salmonelosis en humanos alrededor del mundo (CDC, 2012; EFSA, 2016; Hendriksen et al., 2011). Estos serovares son en su mayoría transmitidos por medio del consumo/manipulación de alimentos contaminados como huevos o carne cruda de pollo (Braden, 2006; Jackson, Griffin, Cole, Walsh, & Chai, 2013).

Se estima que las NTS son responsables de acerca 80.3 millones de casos de gastroenteritis transmitidas por alimentos y 155,000 muertes cada año en el mundo (Majowicz et al., 2010). En los Estados Unidos las NTS pueden afectar a 1 millón de personas, generan 19,586 hospitalizaciones y 378 muertes anualmente (Dekker & Frank, 2015; Scallan et al., 2011); las NTS son también prevalentes en otros países desarrollados como Canadá, donde *S. Infantis* causó 110 casos clínicos entre 2015-2016 (Public Health Agency of Canada, 2017), en el Reino Unido *S. Enteritidis* (33,4%) y *S. Typhimurium* (21,4%) fueron también los principales serovares aislados de 799 muestras fecales durante octubre 2016 (Public Health England., 2016) y a pesar de la tendencia

decreciente de salmonelosis en humanos en la EU desde 2008 (EFESA & ECDC, 2014) perfil 2-9-7-3-2 MLVA de *S. Enteritidis* en casos en humanos aumentaron en Holanda, Bélgica, Noruega, Suecia y Reino Unido el año pasado (ECDC, 2016).

La Salmonelosis en Colombia puede también tener una prevalencia alta; sin embargo, la enfermedad no es apropiadamente notificada-reportada a los centros de salud, a los cuales usualmente les falta laboratorios apropiados para la correcta identificación y dependen del laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) centralizado en Bogotá para obtener una completa identificación, en consecuencia, el impacto de la bacteria en la salud pública no es precisamente conocida en muchas regiones de éste país. El INS de Colombia reportó un total de 10,381 casos de enfermedades transmitidas por alimentos durante el 2015 y una cifra similar durante el 2016, de éstos casos sólo el 15% fueron confirmados por test de laboratorio (INS, 2015). Éste instituto también reportó 7,219 aislados de *Salmonella* de casos clínicos y *S. Typhimurium* (33,7%), *S. Enteritidis* (28,6%) y *S. Typhi* (9,2%) fueron los serotipos más prevalentes. En la región del Tolima, estudios epidemiológicos preliminares han establecido la presencia de *Salmonella* en diferentes sectores de la industria avícola y se han reportado *S. Enteritidis* y *S. Shannon* en granjas de gallinas ponedoras (Rodríguez, Fandiño, Donado, Guzmán, Verjan, et al., 2015), *S. Enteritidis* en superficies de cáscara de huevo del mercado (Mogollón, Rodríguez, & García, 2016) y un total de 14 diferentes serovares de *Salmonella* presentes en canales de pollo vendido en tiendas y supermercados de la ciudad de Ibagué (Rodríguez et al., 2015), estos incluyen *S. Paratyphi B*, *S. Hvitvingfoss*, *S. Muenster*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Braenderup* y *S. Kalina*, entre otros pero no *S. Enteritidis*.

Aunque estos estudios han sido útiles para incrementar las alarmas acerca del riesgo impuesto por *Salmonella* en los productores avícolas, la relación genética entre estos aislados de origen aviar y la *Salmonella* causante de gastroenteritis en humanos no ha sido abordada. Éste estudio fue diseñado para evaluar la relación genética entre aislados de *Salmonella* *Enteritidis* de origen aviar y de humanos con gastroenteritis en Ibagué, usando Multilocus Sequence Typing (MLST), una técnica altamente discriminatoria

usada para subtipificación microbiana, que ha sido empleada en investigaciones epidemiológicas, biología poblacional y la evolución de la patogenicidad relacionada con los rasgos de las bacterias (M. C. J. Maiden, 2006; Pérez-Losada, Cabezas, Castro-Nallar, & Crandall, 2013).

### **3.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.4.1** Diseño del estudio. Un estudio observacional de corte transversal fue realizado (entre agosto y diciembre de 2015) para establecer la prevalencia de *Salmonella* spp., en muestras de heces de casos clínicos de gastroenteritis humana que fueron admitidos en centros de salud de Ibagué, Colombia. El tamaño de la muestra fue calculado por medio de la fórmula descrita por Thrusfield (2007), con un 95% nivel de confianza, 5% de error, y una prevalencia esperada del 5%, dado que no se encontraron estudios sistemáticos sobre *Salmonella* causante de diarrea en humanos en la región de Tolima. El cálculo del tamaño de la muestra fue 73, sin embargo, para el propósito de éste estudio preliminar fueron recolectadas un total de 110 de muestras de heces. El Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) en el año 2015 reportó que *Salmonella* spp. fue aislada en 18/87 muestras biológicas durante la semana 52, con un promedio de 199 casos por semana y un total de 10,831 casos humanos de 895 brotes transmitidos por alimentos (INS, 2015). Basado en esta información puede ser posible que el tamaño de la muestra fuera insuficiente para establecer una prevalencia preliminar, sin embargo, y debido a los fondos insuficientes para desarrollar esta investigación no fue posible aumentar el tamaño de la muestra.

**3.4.2** Recolección de las muestras. El muestreo incluyó dos centros de salud de la ciudad de Ibagué, y un total de 110 muestras de heces fueron recolectadas para el aislamiento de *Salmonella*. Cada muestra fecal fue recogida dentro de recipientes plásticos asépticos en el centro de salud y después transportadas en refrigeración (<4 °C), al Laboratorio Diagnóstico Veterinario, Universidad del Tolima y procesadas en un periodo máximo de 2 horas. Adicionalmente, tres aislados de *S. Enteritidis* obtenidos de la superficie de cáscara de huevo (Mogollón et al., 2016) y tres aislados de *S. Enteritidis*

de cáscara de huevo triturada y ambiente de granjas de ponedoras (Rodríguez, Fandiño, Donado, Guzmán, Verjan, et al., 2015) fueron también incluidas en el estudio.

**3.4.3** Aislamiento de *Salmonella* de las muestras de heces humanas. El aislamiento de *Salmonella* spp., siguió el protocolo del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS, 2014b) y las directrices del estándar internacional ISO 6579:2002 / Amd1:2007 (ISO, 2008). Brevemente, las muestras de heces (hisopos) fueron sembradas directamente en caldo de Tetrathionate (Müller-Kauffmann) incubados a 37°C y una segunda muestra se inoculó en caldo de Rappaport Vassiliadis (MERCK®) y se incubaron a 42 °C por 18 horas, después fueron inoculados en medios de agar de alta selectividad XLT4 (Xylose Lysine Tergitol 4 - MERCK®) y baja selectividad SS (*Salmonella-Shigella*) and McConkey (MERCK®) e incubados a 37 °C por 18 – 24 horas.

Posteriormente, se sembraron colonias compatibles en agar Rambach cromogénico (MERCK®) y se confirmaron como *Salmonella* spp. utilizando pruebas bioquímicas miniaturizadas de BBL Crystal (E / NF®) test para bacterias entéricas no fermentadoras. Los aislados de *Salmonella* fueron además confirmados por medio de aglutinación con antisuero Poli A-I + Vi (Difco® 222641, Becton Dickinson & Co, Sparks, MD). Se incluyeron controles positivos de *S. Typhimurium* (ATCC® 14028™) and *S. Enteritidis* (ATCC® 13076™).

**3.4.4** Serotipificación de los aislados de *Salmonella* spp. Los aislados de *Salmonella* spp. fueron serotipados por medio del esquema de White-Kauffman-Le Minor, los cuales identifican la presencia de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) específicos con antisueros comerciales (Difco, Becton, Dickinson and Company Sparks, MD). La serotipificación fue desarrollada sobre la base de la descripción antigénica de Grimont & Weill (2007) y la nomenclatura descrita por Tindall *et al.* en el (2005), y la Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, (2005). El procedimiento fue llevado a cabo en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

**3.4.5** Test de susceptibilidad antibiótica. El método de Kirby-Bauer (difusión agar-disco) se utilizó para evaluar la susceptibilidad de *Salmonella* a Cloranfenicol (CHL, 30

µg), Florfenicol (FFC, 30 µg), Enrofloxacin (ENR, 5 µg), Norfloxacin (NOR, 10 µg), Fosfomicina (FOF, 50 µg), y Estreptomycin (STR, 10 µg), los cuales son antibióticos comúnmente utilizados en medicina veterinaria pero no incluidos en el método de microdilución automatizado Phoenix™ (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Se inoculó una suspensión bacteriana calibrada de acuerdo a la escala de turbidez McFarland de 0,5 en agar Mueller Hinton II (BBL™) y la inhibición del crecimiento bacteriano sobre el cultivo en placa a 37 °C por de 18 a 24 horas se evaluó de acuerdo a las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).

Los aislados de *Salmonella* también fueron sometidos al test de susceptibilidad antimicrobiana de microdilución Utilizando los paneles BD Phoenix™ NMIC/ID-94 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) y las categorías establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Los antibióticos y la concentración incluidos en este ensayo fueron Amikacin (AMK, 8-32 µg/mL), Amoxicillin-Clavulanate (AMC, 4/2-16/8 µg/mL), Ampicillin (AMP, 4-16 µg/mL), Cefepime (FEP, 1-16 µg/mL), Cefoxitin (FOX, 4-16 µg/mL), Ceftazidime (CAZ, 1-16 µg/mL), Ceftriaxone (CRO, 1-32 µg/mL), Cefuroxime (CXM, 4-16 µg/mL), Ciprofloxacin (CIP, 0.5-2 µg/mL), Ertapenem (ETP, 0.25-4 µg/mL), Gentamicin (GEN, 2-8 µg/mL), Imipenem (IPM, 1-8 µg/mL), Levofloxacin (LVX, 1-4 µg/mL), Meropenem (MEM, 1-8 µg/mL), Piperacillin-Tazobactam (TZP, 4/4- 64/4 µg/mL), Tigecyclin (TGC, 1-4 µg/mL) y Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT, 1/19 - 4/76). En éste estudio, solo los aislados de *Salmonella* de resistencia absoluta pero no los de resistencia intermedia fueron considerados como cepas resistentes. Se definieron como cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples fármacos (MDR) aquellas aisladas que mostraron resistencia fenotípica por lo menos a tres o más clases de antibióticos. Se utilizó *Escherichia coli* ATCC® 25922™ como cepa de referencia.

**3.4.6** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis molecular fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Tolima. El ADN genómico se extrajo de cada aislamiento de *Salmonella* por el método de fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1) (Sambrook & Russell, 2001). Los nueve aislamientos de *Salmonella* fueron amplificados por PCR para el gen *invA* fragmento de

284 bp, usando para la confirmación del género de *Salmonella*, los primers Forward 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' y el reverse 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3' (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) descrito por Rahn *et al.*, (1992). La reacción de PCR se realizó en 25 µL de volumen total utilizando el AccuPrime™ Taq ADN polymerase System (Invitrogen life technologies), conteniendo 2,5 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 µL 10 × buffer, 0,8 µL por cada primer (10 µM), 8 mM de dNTPs, 0,5 µL Taq ADN polymerase y 1 µL de ADN template. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador T-100 (Bio-Rad); con el siguiente programa: una etapa de desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 1 min, anillado a 55 °C por 30 segundos y extensión a 68 °C por 30 segundos, y una etapa de extensión final a 68 °C por 7 minutos. Los productos del PCR fueron mezclados con 2µL de 10× buffer de carga y por último se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 2% con 100 bp ADN purificado (Invitrogen®). El gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo la luz UV usando gel ENDURO™ GDS (Labnet International, Inc.) documentado en el sistema.

**3.4.7** Multilocus Sequence Typing de aislados de *Salmonella* Enteritidis. Nueve aislados de *Salmonella* Enteritidis de granjas ponedoras, superficie de cáscara de huevo y heces humanas fueron sujetas al esquema de Achtman de secuenciación y amplificación PCR de siete genes house-keeping codificando la aspartokinase + homoserine dehydrogenase (*thrA*), phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (*purE*), alpha ketoglutarate dehydrogenase (*sucA*), histidinol dehydrogenase (*hisD*), chorismate synthase (*aroC*), uroporphyrinogen III cosynthase (*hemD*,) y DNA polymerase III beta subunit (*dnaN*,) con los primers descritos en el sitio web de MLST: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>. Las condiciones de PCR consisten de una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por un minuto, con un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit de purificación ADN (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) y seguidamente secuenciados (Macrogen Inc., Korea) en ambas direcciones utilizando el método de secuenciación de Sanger. Las secuencias de ADN se ensamblaron utilizando el software Genetyx versión 7.0 y se

sometieron a la base de datos en línea *Salmonella* MLST de la Universidad de Warwick, para obtener perfiles alélicos y el tipo de secuencia específica de cada aislado.

**3.4.8** Análisis Secuencia de nucleótidos. Los datos de la secuencia de ADN de siete genes house-keeping de *Salmonella* fueron comparados individualmente con los de la base de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) usando el software BLASTN (Versión 2.5.1+) (Zhang, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000) del National Center for Biotechnology Information. Se llevó a cabo una multialineación de secuencias de nucleótido con los programas BioEdit y Genetyx version 7 y el análisis filogenético fue desarrollado con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013), con los parámetros por defecto, utilizando el método de máxima probabilidad. Las secuencias tipo(ST) de *Salmonella* se sometieron a la base de datos de MLST.

## **3.5** RESULTADOS

**3.5.1** Aislamiento de *Salmonella* spp., de muestras de heces humanas. Un total de 110 muestras de heces de pacientes con gastroenteritis se obtuvieron de dos centros de salud en Ibagué, Colombia, donde no se realizan pruebas de aislamiento microbiológico de rutina. *Salmonella* spp., se aisló de diez muestras que mostraron un comportamiento idéntico en las pruebas bioquímicas. Adicionalmente estos aislados de *Salmonella* se confirmaron mediante pruebas de aglutinación con antisuero policlonal anti-A-I and Vi y amplificación mediante PCR del gen *invA* de 284 pb.

**3.5.2** Serovares de *Salmonella* spp., aislados de muestras de heces humanas. Seis diferentes serovares de *Salmonella enterica* fueron identificados en 10 muestras de heces humanas, los serovares predominantes fueron . Enteriditis (4/10) y *S. Typhimurium* (2/10), seguidos por *S. Newport*, *S. Braenderup*, *S. Uganda* and *S. Gruposensis*, cada uno con un aislamiento (Tabla 4).



**3.5.3** Test de susceptibilidad a antibióticos. Todos los aislados de *Salmonella* de humanos con gastroenteritis mostraron resistencia a dos clases de antibióticos: Aminoglucosidos (Amikacina y Gentamicina), y Cefalosporina (Cefoxitina y Cefuroxima), mientras que sólo se encontró que *S. Typhimurium* resultó ser MDR con resistencia a por lo menos nueve antibióticos incluyendo Amikacin, Ampicilina, Cefoxitina, Cefuroxima, Gentamicina, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Estreptomina, Cloranfenicol y Florfenicol. Todos los aislados de *Salmonella* mostraron sensibilidad a Amoxicilina/Clavulanato, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Ertapenem, Imipenem, Levofloxacino, Meropenem, Piperilina / Tazobactam y Tigeciclina. Todos los aislados de *Salmonella* Enteritidis, *S. Braenderup*, *S. Newport*, *S. Gruposensis*, *S. Uganda* y una *S. Typhimurium* fueron también susceptibles a Estreptomina, Cloralfenicol, Enrofloxacina, Norfloxacina y Fosfomicina probados por el método de Kirby-Bauer.

**3.5.4** Multilocus Sequence Typing. Un total de nueve aislados aleatoriamente seleccionados de *Salmonella* Enteritidis de origen aviar y humanos se sometieron a análisis MLST. Los tipos de secuencia identificados (ST) fueron ST3172, ST11 y ST3233, siendo el ST11 el tipo de secuencia más frecuente presente en las granjas de gallinas ponedoras (2/3), superficie de huevos comercializados (2/3) y muestras de heces humanas (3/3) (Tabla 4). La secuenciación forward and reverse se realizó para los siete genes house-keeping de aislados de *Salmonella* Enteritidis y la secuencia de datos ensamblados y corregidos para errores antes de ser presentados a la base de datos MLST.

**Tabla 4.** Serovares y secuencia común (ST) de aislados de *Salmonella* Enteritidis de origen aviar y humanos con gastroenteritis en Ibagué, Colombia.

Código <i>Salmonella</i>	Origen	Serotipo	Alelo	ST	Complejo ST
UTSE- 13001	Granja gallinas ponedoras	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3,</i> <i>HisD7, purE 6, sucA 6,</i> <i>thrA653</i>	ST3172	Desconocido

<b>Código <i>Salmonella</i></b>	<b>Origen</b>	<b>Serotipo</b>	<b>Alelo</b>	<b>ST</b>	<b>Complejo ST</b>
UTSE-13002	Granja gallinas ponedoras	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-13003	Granja gallinas ponedoras	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-14048	Superficie cáscara de huevo*	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-14049	Superficie cáscara de huevo	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-14050	Superficie cáscara de huevo	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 584, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST3233	Desconocido
UTSE-15001	Muestra de heces	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-15002	Muestra de heces	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-15003	Muestra de heces	<i>S. Enteritidis</i>	<i>aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11</i>	ST11	4
UTSE-15004	Muestra de heces	<i>S. Enteritidis</i>	ND	ND	ND
UTST-15020	Muestra de heces	<i>S. Typhimurium</i>	ND	ND	ND
UTSN-15021	Muestra de heces	<i>S. Newport</i>	ND	ND	ND
UTSB-15022	Muestra de heces	<i>S. Typhimurium</i>	ND	ND	ND
UTSB-15023	Muestra de heces	<i>S. Braenderup</i>	ND	ND	ND

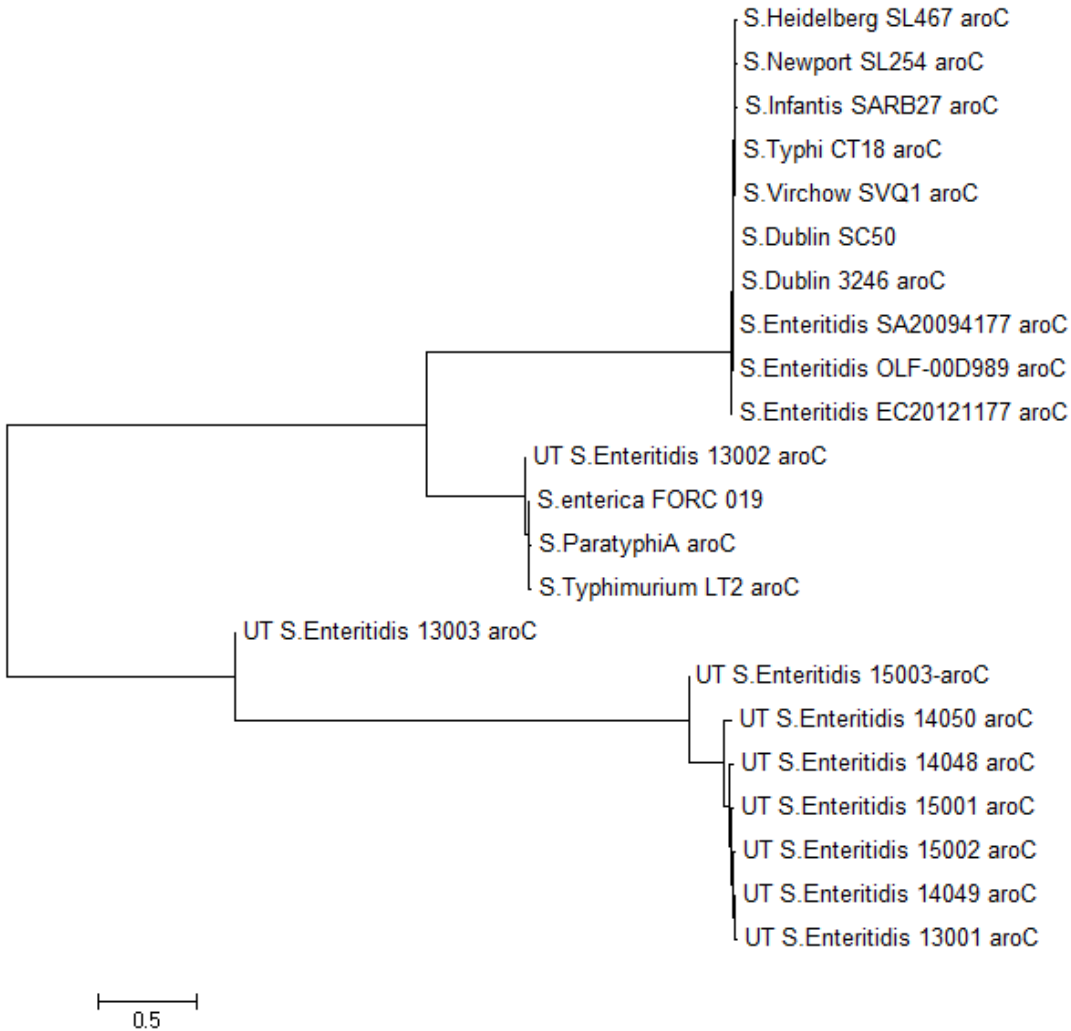
Código <i>Salmonella</i>	Origen	Serotipo	Alelo	ST	Complejo ST
UTSU- 15024	Muestra de heces	<i>S. Uganda</i>	ND	ND	ND
UTSG- 15025	Muestra de heces	<i>S. Grupensis</i>	ND	ND	ND

\*: Huevos recolectados en el mercado; ND: No determinado

**3.5.5** Análisis filogenético. El gen *aroC* de todos los siete genes house-keeping fue seleccionado para un análisis filogenético adicional. La secuencia del gen *aroC* obtenido de aislados de *Salmonella* en la región del Tolima y los depositados en el GenBank fueron alineados, se construyó un árbol filogenético que mostró que las tres secuencias de los genes *aroC* de *S. Enteritidis* obtenidas de muestras de heces humanas, las tres *S. Enteritidis* de la superficie de la cáscara del huevo y un aislamiento obtenido de las granjas de gallinas ponedoras formaron un único cluster que se ramificó de una *S. Enteritidis* obtenida de las granjas de gallina ponedoras (UTSE-13003) en la región de Tolima. Un segundo aislado de *S. Enteritidis* de granjas de gallinas ponedoras (UTSE-13002) se agrupó junto con las cepas de referencia de *Salmonella enterica* FORC\_019, *S. Paratyphi A* y *S. Typhimurium*, LT2, mientras que las otras cepas de referencia formaron un cluster independiente (Figure 4).

**Figura 4.** Análisis molecular filogenético de chorismate synthase gen (*aroC*) de *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* aisladas de humanos con gastroenteritis, de origen aviar y otras cepas de referencia. La historia evolutiva se dedujo mediante método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei (2013). Se muestra el árbol con la más alta probabilidad de logaritmos (-5805.4149). El árbol está dibujado para escalar, con ramificación, longitudes medidas en el número de sustituciones por sitio. Secuencia de nucleótidos de varias cepas de *Salmonella* fueron alineados y la imagen del árbol fue construida usando el programa Análisis de Evolución Genética Molecular, MEGA 6 [2]. Los números de acceso son los siguientes: cepa *Salmonella enterica* FORC\_019, CP012396.1; cepa *S. Enteritidis* OLF-00D989 87-1, CP011942.1; cepa *S. Enteritidis* SA20094177, CP007468.2; cepa *S. Enteritidis* EC29121177, CP007333.2;

cepa *S. Heidelberg* SL476, CP001120.1; cepa *S. Newport* SL254, NC\_011080.1; cepa *S. Infantis* SARB27, NZ\_AFYI00000000.1; cepa *S. Typhi* CT18, AL513382.1; cepa *S. Virchow* SVQ1, NZ\_AZMP00000000.1; cepa *S. Dublin* 3246, CM001151.1; cepa *S. Paratyphi A*, CP000026.1 ; cepa *S. Typhimurium* LT2, NC\_003197.1. Los aislados humanos obtenidos de casos clínicos de gastroenteritis y origen aviar en la región del Tolima son aquellos codificados UT *S. Enteritidis*.



Fuente: Autor

### 3.6 DISCUSIÓN

*Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium* son la causa predominante de NTS en humanos en todo el mundo y esta situación puede ser la misma para muchas regiones en Colombia, donde estudios epidemiológicos muy limitados han abordado el posible vínculo entre los productos de origen aviar y la salmonelosis humana. Aunque, la información epidemiológica necesaria para soportar las fuentes de aislamientos humanos sigue siendo insuficiente en Colombia, según nuestro conocimiento, éste es el primer reporte de éste país describiendo una sequence type ST11 común de *Salmonella* Enteritidis con patrón idéntico de resistencia a los antibióticos entre cepas de origen aviar, particularmente huevos para consumo y heces de humanos con gastroenteritis y esto puede sugerir un papel de los huevos para consumo en la transmisión de salmonelosis no tifoidea en Ibagué Colombia. A pesar de la falta de relación entre el espacio y el tiempo entre los aislamientos de *S. Enteritidis* de las granjas de gallinas ponedoras (año-2013), cáscara de huevos para consumo (año-2014) y aislados clínicos (año-2015), *S. Enteritidis* de cada fuente compartía el mismo perfil alélico, y por tanto el ST. En adición, todas las *S. Enteritidis* mostraron un patrón común resistente a los antibióticos Aminoglucósidos y Cefalosporinas y los análisis filogenéticos utilizando la secuencia del gen *aroC* da soporte para ésta relación e indica que aislados de humanos y de cáscara de huevo de *S. Enteritidis* son indistinguibles y forman un solo cluster que parecen evolucionar de un antepasado común presente en las granjas de gallinas ponedoras (Figura 4). En Argentina se reportó la circulación y transmisión de clones de *S. Enteritidis* con perfiles genómicos PFGE similares y limitada diversidad que fueron aislados de alimentos de origen animal en expendios minoristas en diferentes años de muestreo (Favier, Estrada, Otero, & Escudero, 2013) y la falta de patrones específicos que podrían estar asociados con la fuente o el año de aislamiento fue reportado en *S. Enteritidis* aislado de alimentos (n=61), pollos (60) and humano (67) durante un periodo de 24-años en Brasil usando tipificación MLVA (Campioni, Davis, Medeiros, Falcão, & Shah, 2013). En los Estados Unidos, investigaciones de laboratorio y estudios epidemiológicos identificaron la cáscara de huevo como el mayor vehículo para la infección por *S. Enteritidis* en seres humanos y establecieron que la contaminación interna de los huevos ocurre por medio de la transmisión transovárica de *S. Enteritidis* en gallinas ponedoras (Braden, 2006). *S. Enteritidis* también parece jugar un rol mayor

en la contaminación de huevo en Reino Unido (Martelli & Davies, 2012). Por lo tanto, no fue inesperado encontrar un genotipo común en aislados de origen aviar y humanos en la región de Tolima, y la evidencia proporcionada en este estudio puede ser útil a los centros de salud y las autoridades de salud pública para aumentar la educación sobre los riesgos por *Salmonella* cuando los productos avícolas no son manipulados o cocinados adecuadamente antes de ser consumidos.

De hecho, la comercialización de huevo sucio en tiendas y supermercados que puedan llegar fácilmente a las manos del consumidor es común en ésta ciudad, y la razón de esto es que las granjas de gallinas ponedoras usan predominantemente sistemas de producción en piso, el cual es un factor de riesgo conocido para la contaminación por *S. Enteritidis* de los huevos (Howard, O'Bryan, Crandall, & Ricke, 2012). En adición, los resultados de éste estudio pueden también indicar la falta de protocolos adecuados de limpieza y desinfección de los huevos antes de la venta y la necesidad de un programa de control de calidad y vigilancia más riguroso para *Salmonella* en la región de Tolima por los productores avícolas y las autoridades sanitarias, respectivamente.

Un total de seis serovares diferentes de NTS *S. enterica* se aislaron de diez muestras de heces positivas de personas con gastroenteritis en Ibagué Colombia (Tabla 4). Estos serovares *S. Newport*, *S. Braenderup* y *S. Typhimurium* también fueron aislados frecuentemente a partir de canales de pollo crudas comercializadas en Ibagué (Rodriguez et al., 2015), mientras que *S. Uganda* y *S. Gruposensis* fueron nuevos serovares identificados en la región de Tolima. A pesar de las diferencias en la distribución geográfica de los aislamientos humanos que causan gastroenteritis, nuestros resultados son en cierta medida similares a los reportados en Bangladesh, donde se aislaron nueve diferentes serovares de muestras de heces de casos humanos de gastroenteritis, incluyendo *S. Typhimurium* (n=19), *S. Paratyphi B* var Java (16), *S. Kentucky* (7), *S. Enteritidis* (6), *S. Virchow* (4), *S. Newport* (2), *S. Litchfield* (2), *S. Weltevreden* (1) y *S. Emek* (1) y cinco de estos serovares también fueron aislados comúnmente de aves de producción, siendo un genotipo de *S. Enteritidis* ST11 indistinguible de aves de producción y humanos por PFGE y MLST (Barua, Kumar, Ali,

Olsen, & Peter, 2013). Nuestros resultados sugieren que los casos clínicos de gastroenteritis en humanos en Ibagué podrían ser causados por una variedad de serovares de *Salmonella* spp., y que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* podría tener un papel predominante, los cuales han sido aislados de la cáscara de huevos y la carne de pollo crudo, respectivamente (Rodriguez et al., 2015; Rodríguez, Fandiño, Donado, Guzmán, Verjan, et al., 2015).

Nuestros estudios anteriores reportaron que *S. Enteritidis* estaba presente en las granjas de gallinas ponedoras y en la superficie de los huevos, pero no en la carne de pollo comercializada en tiendas y supermercados de Ibagué Colombia, por lo que en éste estudio comparamos el serovar predominante de *Salmonella* en muestras de heces de pacientes con gastroenteritis con aislamientos de origen aviar. Además, nuestros recursos económicos limitados nos impedían comparar todos los serovares aislados de carne de pollo por MLST. Sin embargo, a excepción de *S. Uganda* y *S. Gruposensis*, nuevos serovares identificados en la región de Tolima, los serovares *S. Newport*, *S. Braenderup* y *S. Typhimurium* encontrados en heces de humanos con gastroenteritis se aislaron comúnmente de canales de pollo comercializado en esta ciudad (Rodriguez et al., 2015) y de estos serovares, *S. Braenderup* fue previamente aislada del hígado de gallinas ponedoras en Colombia mediante la hibridación del ADN (Pulido-Ilandinez, Sanchez-Ingunza, Guard, & Pinheiro, 2014). Son necesarios promover la realización de más estudios para evaluar las relaciones entre los serovares que causan gastroenteritis en humanos y la carne de pollo que se vende en esta ciudad.

En este estudio, *S. Enteritidis* ST11 fue identificada como la secuencia tipo ST común que circula en las granjas de gallinas ponedoras, las superficies de la cáscara de huevo y las heces de humanos con gastroenteritis en Ibagué Colombia. *S. Enteritidis* es conocida por causar enfermedades humanas con proporciones pandémicas (Rodrigue, Tauxe, & Rowe, 1990) y *S. Enteritidis* ST11 fue identificado como un linaje estable y altamente clonal ST aislado de humanos (n=27), Bovino (1), huevo líquido (1) y cáscara de huevo (1) en Japón (Noda et al., 2011), y de muestras clínicas, carne de cerdo y carne de res en Corea (Hyeon et al., 2013), este es el ST más frecuente (44/46) aislados de

muestras clínicas en aves en Brasil (Campioni, Pitondo, Bergamini, & Falcao, 2015; Milanez et al., 2016) y es el único ST común en humanos, aves de producción y marinas en Chile (Retamal et al., 2015). Además, ST11 también fue reportada de carne de pollo (n = 76) en Irán (Ghaderi et al., 2015) y carne de vacuno en Marruecos (Murgia et al., 2015), y es el ST más común en aislados de heces y muestras de sangre de personas en Corea que mostraron Betalactamasas de espectro extendido (ESBL) como CTX-M-14 y CTX-M-15 (Kim et al., 2011). *S. Enteritidis* ST11 también causa Piomiositis en seres humanos (Hwang, Shin, & Lee, 2015) y onfalitis en pollitos (Jones-Dias et al., 2016). Por lo tanto, los datos indican que *S. Enteritidis* ST11 es el genotipo más común que circula en la producción avícola causando NTS en los seres humanos en todo el mundo. A pesar del número limitado de *S. Enteritidis* analizado en este estudio, y el bajo poder discriminatorio atribuido a MLST cuando se usan para clasificar aislados de un mismo serovar (Barco, Barrucci, Elmerdahl, & Ricci, 2013), en este estudio con MLST se pudo discriminar tres diferentes ST de sólo 10 aislados, lo que sugiere que por encima de las desventajas señaladas, MLST podría ser útil para clasificar con un pequeño número de *S. Enteritidis* circulando en regiones geográficas con recursos limitados.

### **3.7 CONCLUSIÓN**

estudio por primera vez proporciona relaciones fenotípicas y genéticas entre *S. Enteritidis* aislados de humanos con gastroenteritis y aislamientos de origen aviar en la región del Tolima. Los datos constituyen una evidencia preliminar del riesgo por el consumo de huevos manipulados inadecuadamente que podrían ser responsables de la transmisión de *S. Enteritidis* a humanos y la necesidad de aumentar la conciencia en los productores avícolas, manipuladores, vendedores y consumidores sobre este riesgo que podría ser prevenido por medio de la educación y la aplicación de sistemas de vigilancia más apropiados y rigurosos para este patógeno.

### **3.8 AGRADECIMIENTOS**



Esta investigación fue financiada por la Oficina Central de Investigación de la Universidad de Tolima a Noel Verjan García (Proyectos Nos. 780213 y 460113). Los autores agradecen a la Dra. Luz Mari Calderón Arateco por proporcionar las muestras clínicas para el aislamiento de *Salmonella*.

#### 4. PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *Salmonella enterica* DE ORIGEN AVIAR Y HUMANO EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA.

##### 4.1 RESUMEN

La Salmonelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por subespecies de *Salmonella enterica*, a través del consumo de alimentos, siendo los productos de origen aviar como el pollo y los huevos la principal vía de transmisión. El uso indiscriminado de antibióticos como terapéuticos o promotores de crecimiento han generado un incremento de cepas resistentes de *Salmonella* comprometiendo la efectividad de los tratamientos. El objetivo del presente estudio fue determinar los patrones de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de muestras de origen aviar y humano en el departamento del Tolima. Para lo cual se utilizaron 34 cepas de *Salmonella* de las cuales 24 fueron de origen aviar correspondientes a 14 aislamientos de granjas avícolas de ponedoras y 10 de huevo en expendio; y 10 cepas de origen humano de pacientes con gastroenteritis. El aislamiento de *Salmonella* de origen humano se realizó mediante el cultivo microbiológico y la identificación mediante serotipificación según el esquema de White-Kauffman-Le Minor. Se realizaron antibiogramas automáticos utilizando el sistema **BD Phoenix™**, panel de antibioticos NMIC/ID-94 *BD* y manual mediante la técnica difusión de disco en gel de agar Kirby-Bauer, según CLSI 2015. Encontrando que la resistencia de *Salmonella* spp. proveniente de la cadena avícola y de humanos con gastroenteritis fue del 100% independientemente de su origen y serovar para los Aminoglucósidos Amikacina y Gentamicina, y a las Cefalosporinas de segunda generación Cefuroxima y Cefoxitina; siendo este un fenómeno natural o adquirido que surge por el uso inadecuado y excesivo de los antibióticos en las diferentes cadenas productivas primarias de alimentos y en medicina humana, por la falta de control en la venta, administración y automedicación. Palabras claves: Multiresistencia, *Salmonella enterica*, Epidemiología.

## 4.2 ABSTRACT

Salmonellosis is a zoonotic disease of global distribution caused by consuming of contaminated food with subspecies of *Salmonella enterica*, being the products of avian origin such as chicken and eggs the main route of transmission. The indiscriminate use of antibiotics as therapeutic or growth promoters has generated an increase in resistant strains of *Salmonella*, compromising the effectiveness of medical treatments. The objective of the present study was to determine the susceptibility and antimicrobial resistance patterns of strains of *Salmonella enterica* isolated from poultry and human with gastroenteritis in the department of Tolima. A total of 34 *Salmonella* were used in this study, of which 24 were of avian origin corresponding to 14 isolates from laying hen farms and 10 from commercialized eggs in the dispensing; and 10 strains of human origin from patients with gastroenteritis. The detection of *Salmonella* of human origin was performed by microbiological culture and identification by serotyping according to the White-Kauffman-Le Minor scheme. Automatic were used with antibiotic panel NMIC / ID-94 *BD* and manual testing using the Kirby-Bauer agar gel disc diffusion technique, according to CLSI (2015). Finding that the antibiotic resistance to *Salmonella* spp., from poultry and humans regardless of its origin and serovar for the aminoglycosides Amikacin and Gentamicin and the second generation cephalosporins cefuroxima and cefoxitina. Being this resistance to antibiotics could be of natural origin or an acquired phenomenon that arises from the inadequate and excessive use of antibiotics in the different primary food production chains and in human medical treatments. In addition, lack of control in antibiotics, administration and self-medication also contribute to this resistance.

**Key words:** *Salmonella enterica*, multiresistence, epidemiology

## 4.3 INTRODUCCIÓN

Salmonelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por subespecies de *Salmonella enterica* (Gutiérrez et al., 2008; Sing, 2013), las cuales son transmitidas al humano a través del consumo de alimentos cárnicos y sus derivados contaminados (Arguello et al., 2013; Atyabi, Zahraei, Ghazisaeedi, & Ashrafi, 2012;

Caffer & Pichel, 2006), por prácticas higiénicas incorrectas (Carrasco et al., 2012; Estrada & Valencia, 2012) o por el contacto directo entre individuos sanos y enfermos (Castañeda, 2016). Los productos de origen aviar como el pollo y los huevos (Adelantado et al., 2008; EFSA, 2010; Parra, Durango, & Máttar, 2002) constituyen la principal vía de transmisión de enfermedad al humano (Rodríguez, Rondón, & Verjan, 2015).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) son un problema creciente y una carga importante de salud pública además de una amenaza para la seguridad alimentaria en los países en vías de desarrollo (Realpe, Muñoz, & Donado, 2016). La Salmonelosis es responsable de aproximadamente 93,8 millones de casos de gastroenteritis por año en todo el mundo (Majowicz et al., 2010). Sólo en la UE, más de 100.000 casos cada año representan una carga económica global estimada en 3 mil millones de euros al año (EFSA, 2014). Durante el 2011, FoodNet identificó un total de 18.964 casos de *Salmonella* confirmados por laboratorios en EEUU, los serotipos más frecuentes fueron *S. Enteritidis* 18%, *S. Typhimurium* 13% y *S. Newport* 12% (EFSA-United Kingdom, 2010). En Colombia en el 2013 se reportaron 1078 casos representando una tasa de crecimiento del 123% con respecto al 2008, predominando los serotipos *S. Typhimurium* 32,80%, *S. Enteritidis* 28,88% y *S. Typhi* con el 8,70% (INS, 2013). La salmonelosis en el humano se caracteriza por gastroenteritis aguda e infecciones sistémicas con complicaciones potencialmente mortales (Crump, Sjlund-Karlsson, Gordon, & Parry, 2015; EFSA, 2011; Wray & Wray, 2000), con un periodo de incubación de 8 a 72 horas (FAO & WHO, 2003). La concentración del microorganismo y sus genes de patogenicidad juegan un papel importante en la enfermedad. Existen numerosos genes de virulencia, que se transmiten fácilmente entre bacterias de la misma especie y de diferentes especies, lo que conduce a una caracterización más difícil de los serovares, y da lugar a diferencias en la patogenicidad (Sing, 2013).

Las especies de *Salmonella* se clasifican en *S. bongori* y *S. enterica* con más de 2.500 serotipos (CDC, 2013; Helke et al., 2016), las cuales contienen diferentes variaciones antigénicas, sólo unos pocos son patógenos comunes entre humanos y animales.

Algunos de los serovares más comunes de *Salmonella enterica* incluyen Cholerasuis, Enteritidis, Heidelberg, Newport y Typhimurium, entre otros (Helke et al., 2016).

El uso indiscriminado de antibióticos en las producciones primarias como terapéuticos o promotores de crecimiento han generado un incremento de cepas de *Salmonella* resistentes (Álvarez , Alonso & García, 2012), lo cual compromete en humanos la efectividad de los tratamientos y prolonga la enfermedad. La resistencia a los antibióticos ha sido considerada como una amenaza global (CDC, 2013; Claudio, Nathanael & Mark , 2015), creando una presión de selección sobre los microorganismos, ya sea proporcionada por los seres humanos, los animales o el medio ambiente (Doyle, 2006). Algunas infecciones humanas causadas por bacterias resistentes a los antibióticos están asociadas con enfermedades transmitidas por los alimentos (Friedman, 2015), convirtiéndose en un grave problema de salud pública. (Donado-Godoy et al., 2012; Helke et al., 2016).

La resistencia a los fármacos en *Salmonella* están mediados por mutaciones en la proteína diana bacteriana, plásmidos, integrones o transposones, modificando o inactivando los antimicrobianos y/o cambiando la permeabilidad de la membrana celular (Walsh, 2000). Donde los plásmidos se auto-repican y pueden transmitirse a los descendientes, o entre dos organismos bacterianos. Un gen de resistencia presente en un plásmido puede integrarse en el cromosoma bacteriano si existe un integrón (Mazel, 2006). Los integrones llevan uno o más genes y pueden ser integrados en el ADN cromosómico o plasmídico del organismo. Los transposones pueden autorregular y reubicar los genes de resistencia que portan (Helke et al., 2016; Sanderson & Nair, 2013).

La mayoría de las especies de *Salmonella* siguen siendo susceptibles a muchas clases de antimicrobianos como los  $\beta$ -lactámicos, Fluoroquinolonas y Aminoglucósidos, sin embargo, frecuentemente se describen nuevos mecanismos de resistencia, como en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fagotipo DT104 (Biedenbach, Toleman, Walsh, & Jones, 2006), la cual muestra resistencia a 5 antimicrobianos: Ampicilina,

Cloranfenicol, Estreptomicina, Sulfametazol y Tetraciclinas (Gebreyes et al., 2004), siendo atribuida a la adquisición de genes de virulencia (Murphy, Buckley, O`connor, Gilroy, & Fanning, 2008). Las resistencias de *Salmonella* a las Fluoroquinolonas se reporta con mayor frecuencia en Europa, Asia e India (Hakanen, Kotilainen, Jalava, & Siitonen, 1999), una mutación al gen *parC* conduce a cepas resistentes a Fluoroquinolonas (Biedenbach et al., 2006). Se abrevia como ACSSUT, esta multiresistencia se debe a la presencia de 5 genes: *acidA2*, *sulI*, *floR*, *TeT*, *pse-1* codificados en su genoma (Akiba et al., 2006).

La determinación de la prevalencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos (RAM) en alimentos de origen animal proporcionan datos basales que pueden utilizarse como parte de un sistema integrado de vigilancia de bacterias RAM y puede facilitar la evaluación de las intervenciones utilizadas para prevenir y controlar la resistencia a los medicamentos (Donado-Godoy et al., 2012), considerándose como bacterias multiresistentes aquellas que presentan resistencia a más de dos antibióticos de grupos farmacológicamente diferentes (Junod, 2010).

La resistencia a los antimicrobianos, como el Cloranfenicol, Ampicilina y Trimetoprim/Sulfametoxazol surgió inicialmente por la captación de nuevo material genético transferible y las resistencias a las fluoroquinolonas surge como resultado de las mutaciones en el genoma bacteriano. Las Fluoroquinolonas y las Cefalosporinas de tercera generación se consideran ampliamente como los antimicrobianos de elección para el Tratamientos de la salmonelosis en humanos. (INFOSAN, 2005).

El objetivo del presente estudio fue determinar los patrones de susceptibilidad y resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella enterica* de origen aviar y humano en el departamento del Tolima.

#### 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

**4.4.1** Cepas bacterianas. Se utilizaron 34 cepas de *Salmonella* de las cuales 24 fueron de origen aviar correspondientes a 14 aislamientos de granjas avícolas de ponedoras (Rodríguez, Fandiño, Donado, Guzmán, & Verjan, 2015) y 10 cepas aisladas de la superficie de huevo en expendio (Mogollon, Rodriguez, & Verjan, 2015) y 10 cepas de origen humano (este estudio) de pacientes con gastroenteritis en centros hospitalarios de la ciudad de Ibagué y procesadas en el Laboratorio Diagnostico Veterinario de la Universidad del Tolima. El periodo de muestreo se realizó entre 2014 y 2015.

**4.4.2** Aislamiento y Serotificación. La detección de *Salmonella* de origen humano se realizó mediante el cultivo microbiológico, según los procedimientos del Instituto Nacional de Salud (INS) y controles positivos de *S* Typhimurium (ATCC® 14028™) y *S*. Enteritidis (ATCC® 13076™). Hisopos impregnados de materia fecal tomadas durante el cuadro clínico de gastroenteritis, se inocularon directamente en caldo Rappaport Vassiliadis y caldo de Tetrionato, incubándose a  $42.0 \pm 1.0$  °C y 37°C respectivamente durante 16 a 18 horas. Posteriormente se sembraron en medios diferenciales de alta selectividad Xilosa Lisina Tergitol-4 (XLT4) y baja selectividad Salmonella Shigella Agar (SS) y Mac Conkey agar, incubando a 37 °C durante 18 a 24 horas, las características de las colonias en estos medios selectivos y diferenciales permitieron el reconocimiento de las colonias típicas de *Salmonella* (Caffer et al., 2008). Las colonias presuntivas fueron cultivadas en agar cromogénico Rambach® y las colonias positivas fueron confirmadas bioquímicamente (Terragno et al., 2003), mediante el sistema miniaturizado de identificación BBL Crystal de bacterias entéricas/no fermentadoras (E/NF)® (Pachon, 2009); Y serológicamente mediante aglutinación con antisuero Poly A - I y Vi (DifcoH 222641, Becton Dickinson y Co, Sparks, MD). Las cepas fueron identificadas mediante serotipificación en el Laboratorio Nacional de Diagnostico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Bogotá, según el esquema de Kauffman-White-Le Minor y almacenadas a -70°C en suspensión bacteriana con glicerol al 25% (Realpe et al., 2016).

**4.4.3** Antibiogramas. La selección de antimicrobianos se basó según el uso en la salud humana y animal; se aplicaron dos procedimientos automático y manual; el primero

utilizó el sistema microbiológico automatizado BD Phoenix™ del Laboratorio de la Clínica Tolima de la ciudad de Ibagué, inoculando suspensiones bacterianas en solución salina fisiológica a partir de cultivos frescos de *Salmonella*, con ajuste de turbidez a 0.5 de la escala de McFarland, utilizando el panel de antibióticos NMIC/ID-94 que incluye: Amikacina, Amoxicilina-Clavulanato, Ampicilina, Cefepima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefuroxima, Ciprofloxacino, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Levofloxacino, Meropenem, Piperacilina-Tazobactam, Tigeciclina y Trimetoprim-Sulfametoxazol (Rambach, 2008). Las especificaciones para el rango de concentración de cada antibiótico en el panel de BD Phoenix™ se enumeran en la Tabla 5. Se utilizó *Escherichia coli* ATCC® 25922™ como organismo de control en cada ensayo.

El método manual de difusión de disco en gel de agar técnica de Kirby-Bauer, se realizó siguiendo los procedimientos y los criterios de interpretación establecidos en Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), con los siguientes antibióticos: Cloralfenicol (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Florfenicol (30 µg), Fosfomicina (50 µg), Norfloxacina (10 µg) y Streptomycin (10 µg). El procedimiento se realizó en el Laboratorio Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Tolima. Este método manual complementó el panel de antibióticos no incluidos en el sistema automático usados frecuentemente en tratamientos en la salud humana y animal, los resultados se categorizaron como: sensible, intermedio o resistente, de acuerdo con la Tabla 6 de interpretación del método de difusión en agar (CLSI, 2015).



**Tabla 5.** Criterios para la interpretación de antibiogramas según el método automático BD Phoenix™ panel NMIC/94.

Base Farmacológica	Antibiótico	Abreviatura	Concentración (µg/disco)	Diámetro de los halos de inhibición (mm)		
				Resistente	Intermedio	Sensible
Aminoglucósidos	Streptomicina	STR	10	≤11	12-14	≥15
Fenoles	Cloranfenicol	CHL	30	≤12	13-17	≥18
Fenoles	Florfenicol	FFC	30	≤14	15-18	≥19
Fluoroquinolonas	Enrofloxacin	ENR	5	≤16	17-22	≥23
Fluoroquinolonas	Norfloxacin	NOR	10	≤12	13-16	≥17
Fosfonatos	Fosfomicina	FOS	50	≤12	13-15	≥18

Elaborado con datos del NCCLS, 2012.

**Tabla 6.** Criterios para la interpretación de antibiogramas según el método automático BD Phoenix™ panel NMIC/94.

Base Farmacológica	Antibiótico	Abreviatura	Concentración (µg/ml)	Diámetro de los halos de inhibición (mm)		
				Resistente	Intermedio	Sensible
AMINOGLUCOSIDOS	Amikacina	AN	8-32	≤11	12-14	≥15
INHIBIDORES β LACTAMASA	Amoxicilina/ Clavulanato	AMC	4/2-16/8	≤12	13-17	≥18
INHIBIDORES β LACTAMASA	Ampicilina	AM	4-16	≤14	15-18	≥19
CEFALOSPORINAS IV	Cefepima	FEP	1-16	≤16	17-22	≥23
CEFALOSPORINAS II	Cefoxitina	FOX	4-16	≤12	13-16	≥17
CEFALOSPORINAS III	Ceftazidima	CAZ	1-16	≤12	13-15	≥18
CEFALOSPORINAS III	Ceftriaxona	CRO	1-32	≤11	12-15	≥15
CEFALOSPORINAS II	Cefuroxima	CXM	4-16	≤12	13-18	≥18
FLUOROQUINOLONAS	Ciprofloxacino	CIP	0,5-2	≤14	15-19	≥19
CARBAPENEMES	Ertapenem	ETP	0,25-4	≤16	17-23	≥23
AMINOGLUCOSIDOS	Gentamicina	GM	2-8	≤12	13-14	≥17
CARBAPENENS	Imipenem	IPM	1-8	≤12	13-13	≥18
FLUOROQUINOLONAS	Levofloxacino	LVX	1-4	≤11	12-16	≥15
CARBAPENENS	Meropenem	MEM	1-8	≤12	13-19	≥18
INHIBIDORES β LACTAMASA	Piperacilina/ Tazobactam	TZP	4/4- 64/4	≤14	15-20	≥19
GLICILICLINA	Tigeciclina	TGC	1-4	≤16	17-24	≥23
INHIBIDORES SÍNTESIS FOLATOS	Trimetoprim/ Sulfametoxazol	SXT	1/19- 4/76	≤12	13-12	≥17

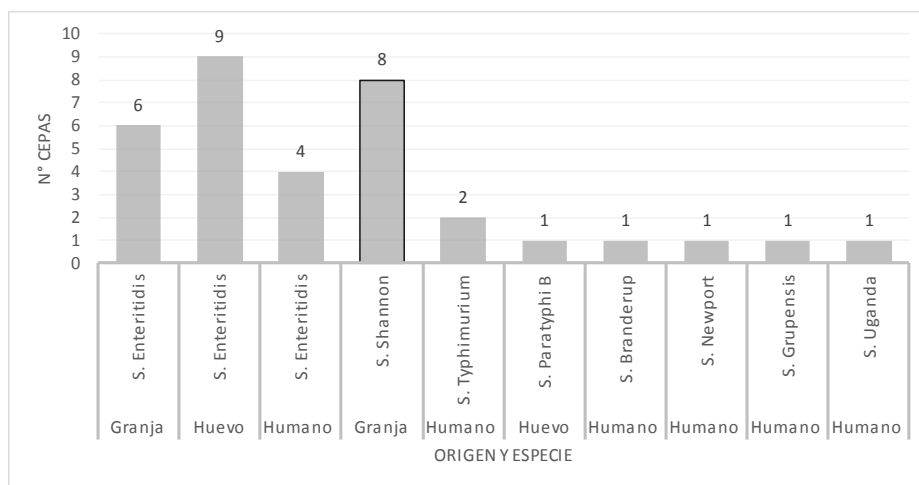
#### 4.5 DISEÑO ESTADÍSTICO

Se aplicó estadística descriptiva para establecer las frecuencias y valores porcentuales de serovares resistentes o susceptibles a antibióticos, a través del programa SPSS 22.

#### 4.6 RESULTADOS

La presente investigación evaluó 34 cepas de *Salmonella enterica*, obtenidas de granjas de ponedoras (14), huevos en expendio (10) y humanos (10), de las cuales 19 cepas correspondieron a *S. Enteritidis* representando el 56%, 8 a *S. Shanon* (24%), 2 a *S. Typhimurium* (6%) y 1 para *S. Paratyphi B*, *S. Branderup*, *S. Newport*, *S. Grupensis* y *S. Uganda*, representando el 3% cada una. Figura 5.

**Figura 5.** Distribución de las cepas de *Salmonella enterica* de granja de ponedora, huevo y humano.



Fuente: el autor

De las 10 cepas obtenidas de pacientes humanos con gastroenteritis, el 40 % correspondió a *S. Enteritidis*, el 20 % a *S. Typhimurium* y el 10% para las demás cepas serotipificadas como se evidencia en la tabla 7.

En las tablas 8 y 9 se recopila el comportamiento de las cepas de *Salmonella enterica* frente a los antibióticos seleccionados en los métodos automático y manual.

**Tabla 7.** Serotipos de *Salmonella enterica* aislada de pacientes con gastroenteritis en la ciudad de Ibagué, Colombia.

Identificación de cepas	n	Distribución de cepas	% de Positivos n: 140
<i>S. Enteritidis</i>	4	40%	2,9%
<i>S. Typhimurium</i>	2	20%	1,4%
<i>S. Branderup</i>	1	10%	0,7%
<i>S. Newport</i>	1	10%	0,7%
<i>S. Grupensis</i>	1	10%	0,7%
<i>S. Uganda</i>	1	10%	0,7%
Totales	10	100%	7,1%

Fuente: el autor

El 100 % de las cepas (n=34) de *Salmonella enterica* independientemente de su origen y serovar fueron resistentes a los Aminoglucósidos Amikacina y Gentamicina y a las Cefalosporinas de segunda generación Cefuroxima y Cefoxitina. Dos cepas de *Salmonella* Enteritidis aisladas de superficie de huevo 10,5% (n=19) presentaron adicionalmente resistencia a la Cefalosporina de tercera generación Ceftriaxona.

La *S. Shannon* mostro una cepa resistente a Trimetoprim/Sulfametoxazol representando el 12,5% de las ocho cepas; la *S. Paratyphi B* presento resistencia a Amoxicilina-Clavulanato, Ampicilina, Ceftazidima, Ceftriaxona y a Trimetoprim/Sulfametoxazol; y una cepa de *S. Typhimurium* resistencia a Ampicilina y a Trimetoprim/Sulfametoxazol, descritos en la tabla 8.

En el método manual de difusión de disco en gel de agar Kirby-Bauer se obtuvo una sensibilidad del 100% (34 cepas) a Norfloxacin y a Fosfomicina; las cepas de *Salmonella* de los serovares Enteritidis, Branderup, Newport, Grupensis y Uganda mostraron sensibilidad a todos los antibióticos como se puede apreciar en la tabla 9.

Tres cepas de *Salmonella enterica* que representan el 8.8% (n=34) correspondientes a los serovares Shannon, Paratyphi B y Typhimurium mostraron resistencia a la Estreptomicina. Frente al Cloranfenicol y al Florfenicol se encontró una cepa de Shannon

y una de Typhimurium resistentes representando el 5,9%; y para la Enrofloxacin se evidencio resistencia en una cepa Shannon y una Paratyphi B representando el 5,9%.

**Tabla 8.** Patrones de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella enterica* mediante el método automático BD Phoenix™ NMIC/94.

Origen de la Cepa	Cepas por categoría	<i>Salmonella</i> Enterica	N° Cepas	Antibióticos																	
				AN <sup>1</sup>	AMC <sup>2</sup>	AM <sup>3</sup>	FEP <sup>4</sup>	FOX <sup>5</sup>	CAZ <sup>6</sup>	CRO <sup>7</sup>	CXM <sup>8</sup>	CIP <sup>9</sup>	EIP <sup>10</sup>	GM <sup>11</sup>	IPM <sup>12</sup>	LVX <sup>13</sup>	MEM <sup>14</sup>	TZP <sup>15</sup>	TGC <sup>16</sup>	SXT <sup>17</sup>	
Granja ponedoras	14	<i>S. Enteritidis</i>	6	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	
		<i>S. Shannon</i>	7	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Shannon</i>	1	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
Huevo	10	<i>S. Enteritidis</i>	7	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Enteritidis</i>	2	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Paratyphi B</i>	1	R	R	R	S	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	R
Humanos	10	<i>S. Enteritidis</i>	4	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Typhimurium</i>	1	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
		<i>S. Typhimurium</i>	1	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Branderup</i>	1	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Newport</i>	1	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Grupensis</i>	1	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Uganda</i>	1	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

<sup>1</sup>Amikacin, <sup>2</sup>Amoxicillin/Clavulanate, <sup>3</sup>Ampicillin, <sup>4</sup>Cefepime, <sup>5</sup>Cefoxitin, <sup>6</sup>Ceftazidime, <sup>7</sup>Ceftriaxone, <sup>8</sup>Cefuroxime, <sup>9</sup>Ciprofloxacin, <sup>10</sup>Ertapenem, <sup>11</sup>Gentamicin, <sup>12</sup>Imipenem, <sup>13</sup>Levofloxacin, <sup>14</sup>Meropenem, <sup>15</sup>Piperacillin/Tazobactam, <sup>16</sup>Tigecycline, <sup>17</sup>Trimethoprim/Sulfamethoxazole, S: Sensible, R: Resistente.

Fuente: el autor

**Tabla 9.** Patrones de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella enterica* mediante el método manual de difusión de disco en gel de agar Kirby-Bauer.

Origen de la Cepa	Cepas por categoría	<i>Salmonella</i> Enterica	N° Cepas	Antibióticos					
				STR <sup>1</sup>	CHL <sup>2</sup>	FFC <sup>3</sup>	ENR <sup>4</sup>	NOR <sup>5</sup>	FOS <sup>6</sup>
Granja ponedoras	14	<i>S. Enteritidis</i>	6	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Shannon</i>	7	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Shannon</i>	1	R	R	R	R	S	S
Huevo	10	<i>S. Enteritidis</i>	9	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Paratyphi B</i>	1	R	S	S	R	S	S
Humanos	10	<i>S. Enteritidis</i>	4	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Typhimurium</i>	1	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Typhimurium</i>	1	R	R	R	S	S	S
		<i>S. Branderup</i>	1	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Newport</i>	1	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Grupensis</i>	1	S	S	S	S	S	S
		<i>S. Uganda</i>	1	S	S	S	S	S	S

<sup>1</sup>Streptomycin, <sup>2</sup>Cloranfenicol, <sup>3</sup>Florfenicol, <sup>4</sup>Enrofloxacin, <sup>5</sup>Norfloxacin, <sup>6</sup>Fosfomicin, S: Sensible, R: Resistente

Fuente: el autor

De las cepas de origen humano, una cepa de *S. Typhimurium* mostró un comportamiento de resistencia a 9 antibióticos correspondientes a 5 grupos farmacológicos. Tabla 10.

**Tabla 10.** Distribución de los patrones de resistencia antimicrobiana según origen y serovares de *Salmonella enterica*.

Cepas por Origen	<i>Salmonella enterica</i>	N° Cepas	% n 34	Antibióticos																				
				AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>	SXT <sup>6</sup>	STR <sup>1</sup>	CHL <sup>4</sup>	FFC <sup>4</sup>	ENR <sup>5</sup>	AMC <sup>3</sup>	AM <sup>3</sup>	FOX <sup>2</sup>	CAZ <sup>2</sup>	CRO <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	CIP <sup>5</sup>	GM <sup>1</sup>	SXT <sup>6</sup>	STR <sup>1</sup>	ENR <sup>5</sup>	
Granja 14	<i>S. Enteritidis</i>	6	17,6	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Shannon</i>	7	20,6	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Shannon</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>	SXT <sup>6</sup>	STR <sup>1</sup>	CHL <sup>4</sup>	FFC <sup>4</sup>	ENR <sup>5</sup>												
Huevo 10	<i>S. Enteritidis</i>	7	20,6	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Enteritidis</i>	2	5,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CRO <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																
	<i>S. Paratyphi B</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	AMC <sup>3</sup>	AM <sup>3</sup>	FOX <sup>2</sup>	CAZ <sup>2</sup>	CRO <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	CIP <sup>5</sup>	GM <sup>1</sup>	SXT <sup>6</sup>	STR <sup>1</sup>	ENR <sup>5</sup>									
Humano 10	<i>S. Enteritidis</i>	4	11,8	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Typhimurium</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	AM <sup>3</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>	SXT <sup>6</sup>	STR <sup>1</sup>	CHL <sup>4</sup>	FFC <sup>4</sup>												
	<i>S. Typhimurium</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Branderup</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Newport</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Gruposensis</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	
	<i>S. Uganda</i>	1	2,9	AN <sup>1</sup>	FOX <sup>2</sup>	CXM <sup>2</sup>	GM <sup>1</sup>																	

Grupos Farmacológicos: Aminoglucósidos<sup>1</sup>; Cefalosporinas<sup>2</sup>; Inhibidores de β Lactamasas<sup>3</sup>; Fenoles<sup>4</sup>; Fluoroquinolona<sup>5</sup>; Inhibidores síntesis folato<sup>6</sup>. Antibiótico: por método automático; **Antibiótico**: por método manual

Fuente: el autor

El 8,8 % de las cepas estudiadas fueron multiresistentes, categorizadas en 3 patrones de antibióticos evidenciados en la tabla 10, representaron el 2,9% cada uno, el primer y segundo patrón mostraron resistencia a 9 antibióticos (AN, FOX, CXM, GM, SXT, STR, CHL, FFC, ENR) y (AN, AM, FOX, CXM, GM, SXT, STR, CHL, FFC) respectivamente, en 5 grupos farmacológicos; el tercer patrón con 12 antibióticos (AN, AMC, AM, FOX, CAZ, CRO, CXM, CIP, GM, SXT, STR, ENR) correspondientes a 5 grupos farmacológicos.

#### 4.7 DISCUSIÓN

El comportamiento de la *Salmonella enterica* frente a los antimicrobianos ha mostrado una creciente prevalencia de la resistencia a antibióticos en las últimas décadas, siendo esto una tendencia de gran importancia epidemiológica para la salud pública mundial (Crump et al., 2015)

En Colombia según el INS en el periodo 2000 a 2013 las cepas aisladas de *Salmonella* procedentes de 7219 muestras clínicas, la *S. Typhimurium* represento el 33.7% (2431) y

S. Enteritidis 28,6% (2064) y mostraron baja resistencia a la amikacina y gentamicina (INS, 2014a); en contraste con el presente estudio en el que se encontró resistencia del 100% a la amikacina y gentamicina en las 10 cepas de origen humano de *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis y otros serovares.

En el presente estudio el 8,8% de las cepas de *Salmonella enterica* de origen aviar y humano fueron clasificadas como multiresistentes, comparado con una investigación en la misma zona geográfica, con 42,35% en carne de pollo en expendios (Cortez, Rodriguez, & Verjan, 2016). Adicionalmente, ninguna de las 34 cepas de *S. enterica* fueron susceptibles a todos los antimicrobianos evaluados, lo cual coincide con los hallazgos encontrados por Donado y col (2012), generando incertidumbre por las prácticas de manejo en los sistemas de producción avícola en Colombia, al encontrar bacterias multiresistentes a antibióticos de uso humano, antes de llegar los productos para su consumo.

Según estudios realizados por Mantilla y Col en el (2010), en cepas de *Salmonella* del grupo D aisladas de ponedoras comerciales en Colombia, determinaron una resistencia total hacia la Estreptomicina, seguida de altas resistencias para Tetraciclina y Florfenicol, y una menor resistencia a la Fosfomicina y al Cloranfenicol, contrastando con la presente investigación con una sensibilidad total en las cepas de origen aviar a la Estreptomicina, Enrofloxacin, Florfenicol, Fosfomicina y Norfloxacin y una resistencia a Amikacina, Cefoxitina, Cefuroxima y Gentamicina.

Un estudio realizado por Donado y col en el 2012, identificó una resistencia en cepas de origen aviar a Ciprofloxacina (47%), y Enrofloxacin (74%), comparado con los resultados del presente estudio donde se evidenciaron resistencias menores para Ciprofloxacina (3%) en una cepa de *S. Paratyphi B* obtenidas de huevo, y a Enrofloxacin (6%) en dos cepas, una de *Paratyphi B* y una de Shannon, coincidiendo con los hallazgos encontrados en un estudio en Venezuela con resistencia a la Ciprofloxacina en un 4% de los aislamientos (Boscán-Duque et al., 2007). En humanos nuestro estudio evidenció sensibilidad de todas las cepas para Ciprofloxacina,

coincidiendo con un reporte en los EEUU de *Salmonella* no tifoidea en 2344 cepas en el 2011, con resistencia de 0,2% a Ciprofloxacina. (NARMS, 2013).

Según la OIE el Cloranfenicol ha sido prohibido en producciones pecuarias con la finalidad de disminuir bacterias RAM en humanos, por lo cual se esperaría encontrar el 100% de sensibilidad, Donado y col en el (2012) y Mantilla y col en el (2010) reportaron una sensibilidad de 86% y 85% respectivamente y en la presente investigación de un 96%, en cepas de origen aviar, lo que indicaría una posible utilización del medicamento.

La *Salmonella* Enteritidis de los orígenes humano y aviar mostraron los mismos patrones de resistencia, a excepción de 2 cepas de origen de huevo que presento resistencia a la Cefalosporina de tercera generación Ceftriaxona siendo esta usada en avicultura y aprobada en el Comité Internacional de la OIE en su 75ª sesión general de mayo de 2007 Resolución N° XXVIII (OIE, 2015). Los primeros informes de resistencia de *Salmonella* no tifoidea a la Ceftriaxona aparecieron a mediados y finales de 1990 (Fey et al., 2000).

En los Estados Unidos en 1995, en una encuesta nacional con 4,003 aislamientos de *Salmonella* encontraron 3 (<0,1%) aislamientos resistentes a Ceftriaxona, cada uno de los cuales habían sido adquiridos fuera de los Estados Unidos (Herikstad et al., 1997).

#### 4.8 CONCLUSIONES

En años recientes se ha observado que la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* de diversos orígenes ha aumentado variablemente en el tiempo, constituyendo un problema de salud pública, con repercusiones económicas y sanitarias, siendo este un fenómeno natural o adquirido que surge por el uso inadecuado y excesivo de los antibióticos en las diferentes cadenas productivas primarias de alimentos y en medicina humana por la falta de control en la venta, administración y automedicación.

De los resultados de ésta investigación se concluye que existe una multiresistencia bacteriana para *Salmonella* spp. en la cadena avícola y en casos clínicos de humanos,

ya que el 8,8 % de las cepas de *Salmonella enterica* fueron multiresistentes; categorizadas en 3 patrones de antibióticos de 9 a 12 antibióticos distribuidos en 5 grupos farmacológicos: Aminoglucósidos, Cefalosporinas, Inhibidores de  $\beta$  Lactamasas, Fluoroquinolona e Inhibidores de síntesis de folatos. Por lo cual se hace necesario realizar estudios moleculares que evalúen si estas cepas multiresistentes son transmitidas a humanos por consumo de alimentos de origen aviar.

Adicionalmente se concluye que las cepas de *Salmonella enterica* independientemente de su origen y serovar fueron sensibles en el 100% a la Cefalosporina de cuarta generación Cefepima, a los Carbapenemes, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, a la Fluoroquinolona Levofloxacin, a la  $\beta$ - Lactamasa Piperociclina/Tazobactan y a la Glicilciclina Tigeciclina usados en medicina humana, y a los grupos farmacológicos Fluoroquinolona y Fosfonatos, Norfloxacin y Fosfomicina, respectivamente usados en producción aviar; siendo esta información muy valiosa al permitir ampliar la gama de tratamientos terapéuticos efectivos en humanos.

Desde el punto de vista epidemiológico la avicultura es una de las producciones pecuarias más estudiadas, ya que las aves son portadoras asintomáticas de los serotipos S. Enteritidis y S. Typhimurium reconocidos mundialmente como los principales agentes etiológicos en los cuadros clínicos por ETAS. Por lo cual se hace necesario implementar controles en los planes y programas de bioseguridad en toda la cadena avícola para minimizar los riesgos de contaminación cruzada de los alimentos y transmisión de multiresistencia por *Salmonella enterica*.



## 5. CONCLUSIONES GENERALES

La presente investigación permitió establecer las relaciones fenotípicas y genotípicas entre *S. Enteritidis* aisladas de humanos con gastroenteritis y productos de origen aviar en la región de Tolima. Constituyendo una evidencia preliminar del riesgo por el consumo de los huevos que han sido mal manipulados y que podrían ser responsables de la transmisión de *S. Enteritidis* a humanos.

Los resultados obtenidos por MLST indicaron que un tipo común de secuencia de *Salmonella* Enteritidis (ST11) está presente en las tres fuentes. Todos los aislados de *S. Enteritidis* de diferentes fuentes mostraron el mismo patrón resistente a antibióticos. *S. Enteritidis* ST11 constituye un vínculo entre el consumo / manipulación de huevos contaminados y la gastroenteritis humana en Ibagué, Colombia.

Las cepas de *Salmonella enterica* independientemente de su origen y serovar fueron sensibles a los antimicrobianos de los grupos farmacológicos usados en producción aviar. La resistencia y multiresistencia a los antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* en la cadena avícola y en casos clínicos de humanos han aumentado variablemente, constituyendo un problema de salud pública, con repercusiones económicas y sanitarias.

## RECOMENDACIONES

Desde el punto de vista epidemiológico la avicultura es una de las producciones pecuarias más estudiadas, ya que las aves son portadoras asintomáticas de los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* reconocidos mundialmente como los principales agentes etiológicos en los cuadros clínicos por ETAS. Por lo cual se hace necesario implementar controles en los planes y programas de bioseguridad en toda la cadena avícola para minimizar los riesgos de contaminación cruzada de los alimentos y transmisión de multiresistencia por *Salmonella enterica*.

El consumo de huevos que han sido mal manipulados y que podrían ser responsables de la transmisión de *S. Enteritidis* a humanos, sugiere la necesidad de crear conciencia en la aplicación de las buenas prácticas higiénico-sanitarias y de manufactura en productores avícolas, manipuladores, vendedores y consumidores que permitan minimizar este riesgo.

La MLST se ha convertido en un elemento esencial en los análisis epidemiológicos, cubriendo las limitaciones de las técnicas fenotípicas, pero aun es necesario realizar estudios moleculares que evalúen si las cepas de *S. Enteritidis* multiresistentes son transmitidas a humanos por consumo de alimentos de origen aviar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aarnisalo, K., Autio, T., Sjoberg, A.-M., Lunden, J., Korkeala, H., & Suihko, M.-L. (2003). Typing of *Listeria monocytogenes* isolates originating from the food processing industry with automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection*, 66(2), 249–255.
- Achtman, M., Wain, J., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., ... Brisse, S. (2012). Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8(6), 19.  
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., ... Brisse, S. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*. 8, e1002776.
- Adelantado, C., Arosema, E., Calvo, M., Manteca, L., Martín, M., Ordoñez, G., ... Zekaria, D. (2008). *La Salmonella de actualidad desde siempre* (1st ed.).
- Akiba, M., Nakamura, K., Shinoda, D., Yoshii, N., Ito, H., Uchida, I., & Nakazawa, M. (2006). Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59(5), 341–345.
- Alexandre, M., Pozo, C., González, V., Martínez, M., Prat, S., Fernández, A., ... Heitmann, I. (2000). Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región metropolitana. *Revista Médica de Chile*, 128(10), 1075–1083. Retrieved from [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872000001000001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000001000001&lng=es&tlng=es). 10.4067/S0034-98872000001000001
- Álvarez E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, C. R. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*, 281–287.
- Arguello, H., Carvajal, A., Naharro, G., Arcos, M., Rodicio, M., M, C., & P., R. (2013).

- Sero- and genotyping of Salmonella in slaughter pigs, from farm to cutting plant, with a focus on the slaughter process. *International J. of Food Microbiology*, 161, 44–52.
- Atyabi, N., Zahraei, T., Ghazisaeedi, F., & Ashrafi, I. (2012). The molecular investigation of widespread Salmonella serovar, S. typhimurium and S. enteritidis, involved in salmonellosis of cattle and sheep in farms around Tehran, Iran. *Teheran: Iranian Journal of Veterinary*.
- Barco, L., Barrucci, F., Elmerdahl, J., & Ricci, A. (2013). Salmonella source attribution based on microbial subtyping. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 193–203. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.005>
- Barua, H., Kumar, P., Ali, K., Olsen, K. E. P., & Peter, J. (2013). Poultry as a possible source of non-typhoidal Salmonella enterica serovars in humans in Bangladesh. *Veterinary Microbiology*, 9. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.020>
- Bayley y Schott. (1982). *Diagnóstico Microbiológico*. (E. I Panamericana, Ed.). Buenos Aires Argentina.
- Biedenbach, D., Toleman, M., Walsh, T., & Jones, R. (2006). Analysis of Salmonella spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54, 13–21.
- Blackall, P. J., Miflin, J. K., Miflin, J. K., Blackall, P. J., & Miflin, J. K. (2000). Identification and typing of Pasteurella multocida : A review Identification and typing of Pasteurella multocida : a review. *Avian Pathology*, 29(October), 271–287. <http://doi.org/10.1080/03079450050118395>
- Boscán-Duque, L. A., Arzálluz-Fisher, A. M., Ugarte, C., Sánchez, D., Wittum, T. E., & Hoet, A. E. (2007). Reduced susceptibility to quinolones among Salmonella serotypes isolated from poultry at slaughter in Venezuela. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2030–2035. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2030>
- Boyd, E. F., Wang, F., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1996). Molecular Genetic Relationships of the Salmonellae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 804–808.

- Braden, C. R. (2006). Salmonella enterica Serotype Enteritidis and Eggs : A National Epidemic in the United States. *FOOD SAFETY*, 43, 6.
- Brankatschk, K., Blom, J., Goesmann, A., Smits, T., & Duffy, B. (2012). Comparative genomic analysis of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Weltevreden foodborne strains with other serovars. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 247–256.
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella Nomenclature. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 38(7), 3.
- Brunia, A. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens*. (Brunia, A.). USA.
- Caffer, M., & Pichel, M. (2006). Evolución de la salmonelosis y brotes hospitalarios por Salmonella spp. en los últimos 15 años. Buenos Aires Argentina: Temas de zoonosis III. R. A. Cacchione, R. Durlach, O. P. Larghi y P. Martino eds. Asociación Argentina de zoonosis, Buenos Aires, Argentina.
- Caffer, M., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de Salmonella spp. Departamento Bacteriología Instituto Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán.”
- Campioni, F., Davis, M., Medeiros, C., Falcão, J., & Shah, D. (2013). MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among S . Enteritidis strains isolated from food , humans and chickens in Brazil in comparison to the North American Strains. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 174–181.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.008>
- Campioni, F., Pitondo, A., Bergamini, A., & Falcao, J. (2015). Comparison of four molecular methods to type Salmonella Enteritidis strains. *APMIS*, 1–5.  
<http://doi.org/10.1111/apm.12367>
- Cardozo-Bernal, Á. M., Ramón, L. F., Poutou-Piñales, R. A., Carrascal-Camacho, A. K., & Zambrano, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de Listeria monocytogenes. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203–222. <http://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp>
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. . (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45, 545–556.

- Castañeda, N. (2016). *Diagnóstico Microbiológico de Salmonella spp. en Alimentos Suministrados a Niños Entre 0-12 Años Ubicados en la Zona Sur del Departamento del Tolima*. Universidad del Tolima.
- CDC. (2012). *Foodborne Diseases Active Surveillance Network FoodNet 2012 Surveillance Report*. Georgia, Atlanta.
- CDC. (2013). An atlas of Salmonella in the United States , 1968-2011. *National Center for Emerging Zoonotic Infectious Diseases. Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases*, 1(1), 1–248. Retrieved from <https://www.cdc.gov/salmonella/>
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2008). *Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*. *Seimc.Org*. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
- Chang, Y. C., Scaria, J., Ibrahim, M., Doiphode, S., Chang, Y. F., Sultan, A., & Mohammed, H. O. (2015). Distribution and factors associated with Salmonella enterica genotypes in a diverse population of humans and animals in Qatar using multi-locus sequence typing (MLST). *Journal of Infection and Public Health*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.013>
- Claudio, R., Nathanael D, R., & Mark P, S. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 139–145. Retrieved from [/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=&lang=pt](/scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt)
- CLSI. (2006). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard-Ninth Edition*. Wayne PA.
- CLSI. (2015). *M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. (M. Tertel, J. Christopher, P. Polgar, T. Dooley, & L. Ochs, Eds.) (Clinical a). USA.
- Coburn, B., Grassl, G., & Finlay, B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112–118. <http://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
- Cooper, J., & Feil, E. (2004). Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends*

- Microbiol 2004;12:373–77.
- Cortez, D., Rodriguez, V., & Verjan, G. (2016). Phenotypic and genotypic antibiotic resistance of Salmonella from chicken carcasses marketed at Ibaguè, Colombia. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 22.
- Crump, J. A., Sjlund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive Salmonella infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 901–937. <http://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- Dekker, J. P., & Frank, K. M. (2015). Salmonella, Shigella, and Yersinia. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 225–246. <http://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.002>
- Díaz, R. (2015). “Tipificación molecular de aislamientos de Salmonella enterica serotipo Derby obtenidos de muestras clínicas y de alimentos en el Principado de Asturias durante los años. Universidad de Oviedo.
- Donado-Godoy, P., Gardner, I., Byrne, B. a., Leon, M., Perez-Gutierrez, E., Ovalle, M. V., ... Miller, W. (2012). Prevalence, Risk Factors, and Antimicrobial Resistance Profiles of Salmonella from Commercial Broiler Farms in Two Important Poultry-Producing Regions of Colombia. *Journal of Food Protection*, 75(5), 874–883. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-458>
- Doyle, E. (2006). Veterinary Drug Residues in Processed Meats — Potential Health Risk. Madison: Food Research Institute de la Universidad de Wisconsin. Retrieved from <https://fri.wisc.edu/news.php?event=2015>
- ECDC. (2016). COMMUNICABLE DISEASE THREATS REPORT. Stockholm, Sweden.
- EFESA, & ECDC. (2014). Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis infections associated with consumption of eggs from Germany. EFESA ECDC (Vol. 21). Stockholm, Sweden. Parma, Italy.
- EFSA. (2010). Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in laying hens. EFSA., 1546.
- EFSA. (2011). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 8, 1658–1918 Available at: <Http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/>

- doc/1658.pdf* Date Last Accessed: May 4, 2011., 8, 1658–1918.
- EFSA. (2014). Food-borne Zoonotic Diseases. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>
- EFSA. (2016). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015* (Vol. 14). <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- EFSA-France. (2010). *FRANCE, TRENDS AND SOURCES OF ZOOSEAS AND ZOOSEAS AGENTS IN HUMANS, FOODSTUFFS , ANIMALS AND IN 2010.*
- EFSA-Germany. (2010). *Germany, TRENDS AND SOURCES OF ZOOSEAS AND ZOOSEAS AGENTS IN HUMANS, FOODSTUFFS , ANIMALS AND IN 2010.*
- EFSA-Ireland. (2010). *IRELAND, TRENDS AND SOURCES OF ZOOSEAS AND ZOOSEAS AGENTS IN HUMANS , FOODSTUFFS , ANIMALS AND IN 2010.*
- EFSA-Sweden. (2010). *SWEDEN, TRENDS AND SOURCES OF ZOOSEAS AND ZOOSEAS AGENTS IN HUMANS, FOODSTUFFS , ANIMALS AND IN 2010.*
- EFSA-United Kingdom. (2010). *United Kingdom, Trends And Sources Of Zoonoses And Zoonotic Agents In Humans, Foodstuffs , Animals And In 2010.*
- Ellermeier, C., & Slouch, J. (2006). The genus Salmonella in Prokaryotes.
- Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *TRENDS IN MICROBIOLOGY*, 7(12), 482–487.
- Estrad, J., & Valencia, B. (2012). *Determinación de Salmonella spp. en Huevos Frescos de Gallina en los Principales Mercados de la Ciudad de Quito.* UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Estrada, J., & Valencia, B. (2012). *Determinación de Salmonella spp. En huevos frescos de gallina en los principales mercados de la Ciudad de Quito.* UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- FAO, & WHO. (2003). *Discussion paper on risk management strategies for Salmonella spp in poultry.* Orlando, Florida.
- FAO/OMS. (2002). Evaluación de riesgos de Salmonella en huevos y pollos. Resumen interpretativo. Serie de evaluaciones de riesgos microbiológicos 1. Ginebra: FAO/OMS. Evaluación de riesgos de Salmonella en huevos y pollos. Resumen interpr.



- Farmer, J. (2003). *Enterobacteriaceas introduction and identification Manual of clinical microbiology*. (8th vol. 1). Washington, D.C.
- Favier, G. I., Estrada, C. S. M. L., Otero, V. L., & Escudero, M. E. (2013). Prevalence , antimicrobial susceptibility , and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis ( PFGE ) of Salmonella spp . isolated from foods of animal origin in San Luis , Argentina. *Food Control*, 29(1), 49–54.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.056>
- Fernández-Cuenca, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(6), 355–360. <http://doi.org/10.1157/13063748>
- Fey, P. D., Safranek, T. J., Rupp, M. E., Dunne, E. F., Ribot, E., Ten, P. C., ... Hinrichs, S. H. (2000). Ceftriaxone-Resistant Salmonella Infection Acquired by a Child from Cattle. *The New England Journal of Medicine*, 342(17), 1242–1249.
- Fitzgerald, C., Sherwood, R., Gheesling, L. L., Brenner, F. W., & Fields, P. I. (2003). Molecular Analysis of the rfb O Antigen Gene Cluster of Salmonella enterica Serogroup O : 6 , 14 and Development of a Serogroup-Specific PCR Assay Molecular Analysis of the rfb O Antigen Gene Cluster of Salmonella enterica Serogroup O : 6 , 14 and Develop. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6099–6105. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6099>
- Flores. Caracterización Fenotípica y Genotípica de Estirpes de Salmonella Choleraesuis Aisladas de Ambientes Marinos (2003).
- Flores, A., & Escolástica, L. (2002). Caracterización Fenotípica y Genotípica de Estirpes de Salmonella Choleraesuis Aisladas de Ambientes Marinos. Retrieved from [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/flores\\_al/antec.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/flores_al/antec.pdf)
- Fournier, P.-E., Drancourt, M., & Raoult, D. (2007). Bacterial Genome Sequencing and its Use in Infectious Diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(11), 711–723.  
[http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70260-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70260-8)
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D., & MARRS, C. F. (2005a). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, 8(1), 1–8. <http://doi.org/10.1186/1742-5573-2-10>

- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D., & Marrs, C. F. (2005b). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations : EP+I*, 2, 10. <http://doi.org/10.1186/1742-5573-2-10>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., & Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47(3), 315–329. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x>
- Friedman, M. (2015). Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3805–3822. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00778>
- Gebreyes, W. A., Davies, P. R., Turkson, P.-K., Morrow, W. E. M., Funk, J. A., Altier, C., & Thakur, S. (2004). Characterization of Antimicrobial-Resistant Phenotypes and Genotypes among *Salmonella enterica* Recovered from Pigs on Farms, from Transport Trucks, and from Pigs after Slaughter. *Journal of Food Protection*, 67(4), 698–705. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2004/00000067/00000004/art00011>
- Ghaderi, R., Tadayon, K., Khaki, P., & Mosavari, N. (2015). Iranian clonal population of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis , characterized by multi-locus sequence typing ( MLST ) method. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(5), 251–259.
- Graves, L. M., & Swaminathan, B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2), 55–62. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00501-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00501-8)
- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars. Paris Francia.
- Guibourdenche, M., & Roggentin, P. (2010). Distribución de los serotipos de *Salmonella* por especies y subespecies.
- Gutiérrez, A., Paasch, L., & Calderón, N. (2008). Salmonellosis and campylobacteriosis, the most prevalent zoonosis in the world. *Vet. Méx.*, 39(1), 81–90.
- Hadjinicolaou, A. V, Demetriou, V. L., Emmanuel, M. A., Kakoyiannis, C. K., & Kostrikis,

- L. G. (2009). Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiology*, 9(97), 1–14. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-97>
- Hakanen, A., Kotilainen, P., Jalava, J., & Siitonen, A. (1999). Detection of Decreased Fluoroquinolone Susceptibility in Salmonellas and Validation of Nalidixic Acid Screening Test Detection of Decreased Fluoroquinolone Susceptibility in Salmonellas and Validation of Nalidixic Acid Screening Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3572–3577.
- Harbottle, H., White, D. G., McDermott, P. F., Walker, R. D., & Zhao, S. (2006). Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2449–57. <http://doi.org/10.1128/JCM.00019-06>
- Helke, K. L., McCrackin, M. A., Galloway, A. M., Poole, A. Z., Salgado, C. D., & Marriott, B. P. (2016). Effects of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne salmonellosis in humans: A systematic literature review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(September), 75. <http://doi.org/10.1080/10408398.2016.1230088>
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlslose, S., Lo, D., Jensen, A. B., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2011). Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank : Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. *FOOD PATHOGENS AND DISEASE*, 8(8), 887–899. <http://doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>
- Herikstad, H., Hayes, P., Mokhtar, M., Fracaro, M. L., Threlfall, E. J., & Angulo, F. J. (1997). Emerging Quinolone-Resistant *Salmonella* in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 3(3), 371–372. <http://doi.org/10.3201/eid0303.970316>
- Howard, Z. R., O’Byrne, C., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2012). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs : Current issues and prospects for control. *FRIN*, 45, 755–764. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.030>

- Hwang, J.-H., Shin, G.-W., & Lee, C.-S. (2015). Community-Onset Pyomyositis Caused by a *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Sequence Type 11 Strain Producing CTX-M-15 Extended-Spectrum B-Lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1439–1441. <http://doi.org/10.1128/JCM.03097-14>
- Hyeon, J., Chon, J., Park, J., Kim, M., Oh, Y., Choi, I., & Seo, K. (2013). A Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates Obtained from Food and Human Sources. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 4(1), 27–33. <http://doi.org/10.1016/j.phrp.2012.12.005>
- INFOSAN, R. I. de A. de inocuidad de los alimentos. (2005). Resistencia antimicrobiana a *Salmonella*. Ginebra. Retrieved from [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_03\\_Salmonella\\_Apr05\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf)
- INS. (2013). *Grupo de Microbiología Fuente: Grupo de Microbiología*. Colombia.
- INS. (2014a). Características de los aislamientos de *Salmonella* spp . Colombia Resultados de la vigilancia. Bogotá D.C: Instituto Nacional de Salud.
- INS. (2014b). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Fiebre Tifoidea y Paratifoidea.
- INS. (2015). Boletín Epidemiológico numero 21 de 2015.
- ISO. (2008). ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., & Chai, S. J. (2013). Outbreak-associated *Salmonella enterica* Serotypes and Food Commodities, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1239–1244.
- Jay, J., Loessner, M., & Golden, A. (2005). *Food Modern Microbiology*. (S. Science, Ed.) (Seventh Ed). USA.: Jay J, Loessner M, Golden A. Food Modern Microbiology. Seventh Edition. Springer Science. USA. 2005. Pp. 619-639.
- Jay, L., Loessner, M., & Golden, A. (2005). *Food Modern Microbiology* (Septima ed). USA.
- Jones-Dias, D., Clemente, L., Egas, C., Froufe, H., Sampaio, D., Vieira, L., ... Canina, M. (2016). *Salmonella* Enteritidis Isolate Harboring Multiple Efflux Pumps and Pathogenicity Factors , Shows Absence of O Antigen Polymerase Gene. *Frontiers in Microbiology*, 7, 9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01130>
- Jordan, K., & Dalmasso, M. (2015). *Pulse Field Gel Electrophoresis*. (H. Press, Ed.)

- (Kieran, Jo). Ireland.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. (2005). The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* ( ex Kauffmann and Edwards 1952 ) Le Minor and Popoff 1987 , with the type strain LT2 T , and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epith. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 519–520. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63579-0>
- Junod, T. (2010). *SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE Salmonella enterica DE ORIGEN ANIMAL Y ALIMENTARIO*. Universidad de Concepción.
- Keller, L., Benson, C., Krotec, K., & Eckroade, R. (1995). *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect Immun* 63: 2443–2449.
- Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T. T., & Brisabois, A. (2010). Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 134–137. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, B., Dougan, G., & Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old *Infection*. *Genetics and Evolution*, 2(1), 39–45.
- Kim, Y., Kwon, I., Hoon, S., Hoon, C., Kyung, H., Ahn, J., ... Lee, K. (2011). Occurrence of IncFII plasmids carrying the bla CTX-M-15 gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sequence type 11 in Korea ☆. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71(2), 171–173. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.004>
- Labarca, J. (2002). Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular ANTIBIOTYPE UTILIZATION AS AN EPIDEMIOLOGICAL MARKER IN NOSOCOMIAL INFECTIONS: COMPARISON WITH MOLECULAR EPIDEMIOLOGY. *Rev Chil Infect*, 19(2), 157–160.
- Lake, R., Hudson, A., & Cressey, P. (2002). Risk profile: *Salmonella* (non typhoid) in poultry (Whole and Pieces).
- Langridge, G. C., Wain, J., & Nair, S. (2013). Invasive Salmonellosis in Humans.

- ECOSALPLUS*, 14. <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2 . 0, 23(21), 2947–2948. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lind, L., Reeser, J., Stayman, K., Deasy, M., Moll, M., & Weltman, A. (2007). Salmonella Typhimurium Infection Associated with Raw Milk and Cheese Consumption --- Pennsylvania. *CDC MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 54(44), 1161–1164.
- Liu, W., Liu, B., Zhu, X., Yu, S., & Shi, X. (2011). yping, Diversity of Salmonella isolates using serotyping and multilocus sequence. *Food Microbiology*, 28, 1182–1189.
- Lukinmaa, S., Aarnisalo, K., Suihko, M., & Siitonen, A. (2004). Diversity of Listeria monocytogenes isolates of human and food origin studied by serotyping , automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis.
- Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E., Morelli, G., Russell, J., Urwin, R., ... Spratt, B. (1998). Multilocus sequence typing : A portable approach to the identification of clones within populations of. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(1), 3140–3145.
- Maiden, M. C. J. (2006). Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 60, 561–588. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>
- Majowicz, S., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F., Kirk, M., O'brien, S., ... Hoekstra, R. (2010). The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 882–889.
- Mamina, C., Manfreda, G., Aleo, A., De Cesare, A., Pellissier, N., Romani, C., ... Pontello, M. (2009). Molecular Typing Reveals Frequent Clustering among Human Isolates of Listeria monocytogenes in Italy Molecular Typing Reveals Frequent Clustering among Human Isolates of Listeria monocytogenes in Italy. *Journal of Food Protection*, 72(4), 876–880.
- Martelli, F., & Davies, R. (2012). Salmonella serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International*, 45, 745–754.
- Martínez-ballesteros, I., Paglietti, B., Rementeria, A., Laorden, L., Bikandi, J., Rubino, S., & Garaizar, J. (2012). Original Article Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of Salmonella. *J Infect*

- Dev Ctries*, 6(5), 443–451. Retrieved from  
[http://www.sid.ir/En/VEWSSID/J\\_pdf/102320123907.pdf](http://www.sid.ir/En/VEWSSID/J_pdf/102320123907.pdf)
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*, 4(8), 608–620. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
- McQuiston, J. R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B. C., Doyle, J., Fields, P. I., Tauxe, R. V., & Logsdon, J. M. (2008). Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7060–7067. <http://doi.org/10.1128/JB.01552-07>
- McQuiston, J. R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F., & Fields, P. I. (2004). Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *fliA* from *Salmonella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1923–32. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1923-1932.2004>
- Meiden, M., & Aanensen, D. (2007). MLST.
- Mercado, M., Ávila, J., Rey, M., Montoya, M., Gamboa, A., Carrascal, A., & Correa, D. (2012). Brotes por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo. *Biomédica*, 32, 375–385. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.697>
- Milanez, G. P., Nascimento, L. C., Holtz, A., Zuanaze, M., Prazeres, D., Guimaraes, G., & Brocchi, M. (2016). Whole-Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Phage Type 4, Isolated from a Brazilian Poultry Farm. *American Society for Microbiology*, 4(3), 4–5. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00340-16>. Copyright
- Millemann, Y. (1998). Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles. *Veterinary Research*, 29(1), 3–19.
- Miya, S., Kimura, B., Sato, M., Takahashi, H., Ishikawa, T., & Suda, T. (2008). Author's personal copy Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 239–249. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.023>
- Mogollón, C., Rodríguez, V., & García, N. (2016). Prevalence and molecular

- identification of *Salmonella* spp . isolated from commercialized eggs at Ibagué , Colombia. *SALUD ANIMAL*, 38(3), 164–172.
- Mogollon, D. C., Rodríguez, V., & Verjan, N. (2015). Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp., contamination of eggs marketed at Ibagué, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 8(1), 20–28.
- Murgia, M., Bouchrif, B., Timinouni, M., Al-qahtani, A., Al-ahdal, M., Cappuccinelli, P., ... Paglietti, B. (2015). International Journal of Food Microbiology Antibiotic resistance determinants and genetic analysis of *Salmonella enterica* isolated from food in Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 31–39.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.003>
- Murphy, B., Buckley, J., O`connor, E., Gilroy, D., & Fanning, S. (2008). Comparison of *Salmonella* species recovered from Irish liquid milk production holdings with temporal clinical veterinary isolates. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211, 283–291.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. (E. Mosby., Ed.) (6° ed.). Madrid.
- NARMS. (2013). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria Human Isolates Final Report. *Centers for Disease Control and Prevention*.  
<http://doi.org/10.1093/infdis/jis901>
- Nassonova, E. S. (2008). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and applications. *Tsitologiya*, 50(11), 927–935.  
<http://doi.org/10.1134/S1990519X08060011>
- Noda, T., Murakami, K., Asai, T., Etoh, Y., Ishihara, T., Kuroki, T., ... Fujimoto, S. (2011). Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 38. <http://doi.org/10.1186/1751-0147-53-38>
- Olive, M., & Bean, P. (1999). MINIREVIEW Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms, 37(6), 1661–1669.
- Pachon, D. (2009). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SEROTIPIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS DEL GÉNERO *Salmonella* EN UNA POBLACIÓN DE *Crocodylus intermedius* Y TESTUDINOS MANTENIDOS EN CAUTIVERIO EN LA ESTACIÓN DE BIOLOGIA TROPICAL ROBERTO FRANCO E.B.T.R.B DE LA



FACULTAD DE CIENCIA, 115.


- Parker, C. T., Asokan, K., & Carlson, R. W. (1999). Clinical and Veterinary Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Defective in Lipopolysaccharide O-Chain Polymerization Clinical and Veterinary Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Defective in Lipopolysaccharide O-Chain Polymeri. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2195–2201.
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). MICROBIOLOGÍA, PATOGÉNESIS, EPIDEMIOLOGÍA, CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Salmonella*. *MVZ-CÓRDOBA*, 7(2), 187–200.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 38–53.  
<http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009>
- Popoff, M., & Le MinoR, L. (2001). Formules antigeniques des serovars des *Salmonella*. WHO collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur. Paris.
- Public Health Agency of Canada. (2017). Public Health Notice - Outbreak of *Salmonella* infections under investigation. Public Health Agency of Canada.
- Public Health England. (2016). *Salmonella infections (faecal specimens) England and Wales, laboratory reports (PHE salmonella data set): October-November 2016*.
- Pulido-landinez, M., Sanchez-Ingunza, R., Guard, J., & Pinheiro, V. (2014). Presence of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in Commercial Laying Hens Diagnosed with Fowl Typhoid Disease in Colombia. *AVIAN DISEASES*, 58(1), 165–170.
- Rahn, K., De Grandis, A., Clarke, R., McEwen, A., Galán J, E., Ginocchio, & Al., E. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 1992 Aug, 6, 271–279.
- Rahn, K., De Grandis, S. a, Clarke, R. C., McEwen, S. a, Galán, J. E., Ginocchio, C., ... Gyles, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of

- Salmonella. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 271–279. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1528198>
- Rambach, A. (2008). BD Phoenix™. Retrieved from [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br\\_222786.pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_222786.pdf)
- Rasschaert, G., Houf, K., & L., D. Z. (2007). Impact of the slaughter line contamination on the presence of Salmonella on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 333–341. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03248.x>
- Realpe, M. E., Muñoz, Á. B., & Donado, P. (2016). Epidemiología de salmonella spp., Listeria monocitogenes y Campylobacter spp., en la cadena productiva avícola. *IATREIA*, 29(4), 397–406. <http://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v29n4a01.397>
- Retamal, P., Fresno, M., Dougnac, C., Gutierrez, S., Gonall, V., Vidal, R., ... Abalos, P. (2015). Genetic and phenotypic evidence of the Salmonella enterica serotype Enteritidis human-animal interface in Chile Genetic and phenotypic evidence of the Salmonella enterica serotype Enteritidis human-animal interface in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6, 11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00464>
- Revazishvili, T., Kotetishvili, M., Stine, O. C., Kreger, A. S., Morris, J. G., & Sulakvelidze, A. (2004). Comparative Analysis of Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterizing Listeria monocytogenes Strains Isolated from Environmental and Clinical Sources. *J. Clin. Microbiol*, 42(1), 276–285. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.1.276>
- Rodrigue, D. C., Tauxe, R. V., & Rowe, B. (1990). International increase in Salmonella enteritidis : A new pandemic ? *Epidemiol. Infect*, 105, 21–27.
- Rodriguez, J., Rondón, I., & Verjan, N. (2015). Serotypes of Salmonella in Broiler Carcasses Marketed at Ibague, Colombia. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17(4), 545–552. <http://doi.org/10.1590/1516-635X1704545-552>
- Rodríguez, R. (2015). *Prevalencia y Caracterización Molecular de Salmonella Spp, en Granjas Avícolas de Postura Comercial en el Departamento del Tolima*. Universidad del Tolima. Retrieved from [http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/1548/1/RIUT-HCA-spa-2015-Prevalencia y caracterización molecular de Salmonella spp, en granjas avícolas de postura comercial en el departamento del Tolima.pdf](http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/1548/1/RIUT-HCA-spa-2015-Prevalencia%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20molecular%20de%20Salmonella%20spp,%20en%20granjas%20av%C3%ADcolas%20de%20postura%20comercial%20en%20el%20departamento%20del%20Tolima.pdf)

- Rodríguez, R., Fandiño, C., Donado, P., Guzmán, L., & Verjan, N. (2015). Characterization of Salmonella from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia. *Avian Diseases*, 59(1), 57–63. <http://doi.org/10.1637/10873-052714-Reg>
- Rodríguez, R., Fandiño, C., Donado, P., Guzmán, L., Verjan, N., Fandin, A. C., ... Rodri, R. (2015). Characterization of Salmonella from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia Characterization of Salmonella from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia. *Avian Diseases*, 59(1), 57–63. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1637/10873-052714-Reg>
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., & Rice, P. (2000). Artemis : sequence visualization and annotation, 16(10), 944–945.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, K., & Nair, S. (2013). Taxonomy and Species Concepts in the Genus Salmonella. In P. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals vol 2*. (2nd Editio, pp. 1– 564). Oxfordshire: COBI. <http://doi.org/10.1079/9781845939021.0000>
- Sastre, A., Sastre, M., Tortuero, F., Suárez, G., & López, C. (2002). *L e c c i o n e s s o b r e l h u e v o*. Barcelona.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V, Widdowson, M., Roy, S. L., ... Griffi, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States — Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15. <http://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67–75. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5)
- Selander, R., Caugant, D., Ochman, H., Musser, J., Gilmour, M., & Whittam, T. (1986). Population Genetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 873–884.
- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M. L., Wiedmann, M., & Moreno Switt, A. I. (2013). Molecular methods for serovar determination of Salmonella. *Critical Reviews in Microbiology*, 7828(3), 309–325. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2013.837862>

- Sing, A. (2013). *Zoonoses—Infections Affecting Humans and Animals*. (S. Andreas, Ed.). Bayern Germany: Springer.
- Stanchi, O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. (Intermedica, Ed.) (primera). Buenos Aires.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6 . 0. *Mol Biol Evol*, 30(12), 2725–2729. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Technelysium, P. L. A. (2016). Chromas 2.6. Retrieved from <http://technelysium.com.au/wp/>
- Terragno, R., Caffer, M., Bruna, S. y, & Binsztein, N. (2003). Manual de Procedimientos. Salmonella: Parte I. Aislamiento, Identificación y Serotipificación. Buenos Aires.
- Thrusfield, M. (2007). *Veterinary Epidemiology*. (B. Publ, Ed.) (3rd ed.).
- Timoney, J., Shivaprasad, H., Baker, R., & Rowe, B. (1989). Egg transmission after infection of hens with Salmonella Enteritidis phage type 4. *Avian Dis* 45.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 55, 521–524. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>
- Tobes, R., & Pareja, E. (2006). Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC Genomics*, 7(1), 62. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-7-62>
- Torpdahl, M., Skov, M., Sandvang, D., & Baggesen, D. (2005). Genotypic characterization of Salmonella by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *Journal of Microbiological Methods*, 63(2), 173–184. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.006>
- Turner, K. M. E., & Feil, E. J. (2007). The secret life of the multilocus sequence type, 29, 129–135. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.002>
- Vásquez, R., Sierra, P., & López, L. (2011). Manual de prevención y control en.
- Vílchez, G., & Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de La*

- Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 6–12.
- Vílchez, G., & Alonso, G. (2009). Artículo de revisión Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos Scope and limitations of molecular methods applied to epidemiological studies, 6–12.
- Virdi, J. S., & Sachdeva, P. (2005). Molecular heterogeneity in *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica* -like *Y. enterocolitica* -like *Y. enterocolitica* species – Implications for epidemiology, typing and taxonomy. *Immunology and Medical Microbiology*, 45(1), 1–10.  
<http://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.03.006>
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775–781. <http://doi.org/10.1038/35021219>
- Wattiau, P., Boland, C., & Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7877–7885.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.05527-11>
- World Health Organization, & Pasteur Institut. (2007). ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS. Paris.
- Wray, C., & Wray, A. (2000). *Salmonella in animals domestics*. (W. A. E. Wray C, Ed.). Publishing Cabi.
- Zaidi, N., Konstantinou, K., & Zervos, M. (2003). The Role of Molecular Biology and Nucleic Acid Technology in the Study of Human. *Molecular Methods in Human Infections*, 127(1), 1099.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences, 7(1-2), 203–214.

 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO	con C.C N°	35'464.229
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

No Autorizar  Motivo: \_\_\_\_\_


La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **USO DE MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) EN LA TIPIFICACION MOLECULAR DE Salmonella spp. AISLADAS DE LA CADENA AVÍCOLA EN EL TOLIMA**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**MAGISTER EN CIENCIAS PECUARIAS CON ÉNFASIS EN AVICULTURA**

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Artículo publicado en revista:


---

- Capítulo publicado en libro:

---

- Conferencia a la que se presentó:

---

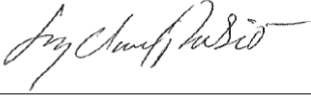
 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **14** Mes: **FEBRERO** Año: **2018**

Autores:

Firma

Nombre:	LUZ CLEMENCIA FANDIÑO DE RUBIO		C.C.	35'464.229
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.