

Técnicas microbiológicas y moleculares para la identificación de *Salmonella* sp en la industria avícola: una revisión sistemática de alcance

Microbiological and molecular techniques for the identification of *Salmonella* sp in the poultry industry: a systematic scoping review

Valentina Mondragon G.^{1*}, Natalia Moreno J.¹, Ligia Sánchez L.¹, Arlen P. Gomez²

RESUMEN

Se realizó una revisión sistemática de los métodos de diagnóstico descritos en la literatura para la identificación y caracterización de especies del género *Salmonella*. La revisión se realizó utilizando publicaciones de 2015 a 2021 registradas en las bases de datos de NCBI/PubMed, ScienceDirect, Scopus, SciELO, Google Scholar y Springer, aplicando la metodología PRISMA. Se analizaron 61 artículos, agrupando los datos según el país de origen, tipo de muestra, técnica utilizada, protocolo de microbiología empleado y genes utilizados en las pruebas moleculares. Los protocolos de microbiología se basan en pruebas de pre-enriquecimiento en agua peptonada y enriquecimiento en caldos de tetracionato (TT) y Rappaport-Vassiliadis (RV), especialmente con muestras de heces o muestras ambientales, para posteriormente realizar los aislamientos en medios selectivos y diferenciales. La identificación de algunas serovariedades de *Salmonella* sp que causan enfermedad en las aves se realiza principalmente con técnicas moleculares (PCR convencional y PCR multiplex), basándose en la detección de genes como *invA*, *hilA*, *fliC*, *sefA*, *spvC*, *pefA*, *speC* y *glgC*. Las herramientas moleculares son una alternativa a las técnicas tradicionales de microbiología y serotipificación con la metodología White-Kauffmann–Le Minor, por requerir de menos tiempo y poder identificar a los serovares; sin embargo, las herramientas microbiológicas como el enriquecimiento contribuyen en el paso previo al empleo de otras herramientas diagnósticas.

Palabras clave: aves de corral, diagnóstico, enterobacterias, PCR, salud pública

¹ Grupo de Investigación Ceparium; Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia

² Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

* E-mail: valentina010800@gmail.com

Recibido: 24 de septiembre de 2021

Aceptado para publicación: 7 de noviembre de 2022

Publicado: 22 de diciembre de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

A systematic review of the diagnostic methods described in the literature for the identification and characterization of species of the genus *Salmonella* was carried out. The review was carried out using publications from 2015 to 2021 registered in the NCBI/PubMed, ScienceDirect, Scopus, SciELO, Google Scholar and Springer databases and applying the PRISMA methodology. In total, 61 articles were analysed, grouping the data according to country of origin, type of sample, technique, microbiology protocol and genes used in molecular tests. The microbiology protocols are based on performing pre-enrichment in peptone water and enrichment in tetrathionate (TT) and Rappaport-Vassiliadis (RV) broths, especially with faecal or environmental samples, to subsequently carry out isolations in selective and differential media. The identification of some *Salmonella* sp serovars that cause disease in poultry is mainly done with molecular techniques such as conventional PCR and multiplex PCR, based on the detection of genes such as *invA*, *hilA*, *fliC*, *sefA*, *spvC*, *pefA*, *speC* y *glgC*. Molecular tools are an alternative to traditional microbiology and serotyping techniques with the White-Kauffmann-Le Minor methodology, as they require less time and can identify serovars; however, microbiological tools such as enrichment contribute to the step prior to the use of other diagnostic tools.

Key words: poultry, diagnosis, enterobacteria, PCR, public health

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* se caracteriza por tener bacilos Gram negativos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son microorganismos anaerobios facultativos y tienen la capacidad de producir ácido sulfhídrico (H₂S). Se conocen dos especies denominadas *S. enterica* y *S. bongori*, siendo de interés para la salud humana y animal *S. enterica*, la cual se subdivide en seis subespecies: *S. enterica* subsp *enterica*, *S. enterica* subsp *salamae*, *S. enterica* subsp *arizonae*, *S. enterica* subsp *diarizonae*, *S. enterica* subsp *houtenae* y *S. enterica* subsp *indica* (Kauffman, 1961).

La taxonomía de *Salmonella* es compleja debido a que cuenta con más de 2500 variantes serológicas según la clasificación del esquema de White-Kauffmann-Le Minor, la cual se basa en la presencia de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (Switt *et al.*, 2009), de allí la dificultad de utilizar la técnica de diagnóstico más apropiada.

Los biovares específicos causantes de enfermedades en aves son *S. Gallinarum* que ocasiona la fiebre tifoidea aviar y *S. Pullorum* causante de pulorosis aviar (Barrow y Freitas Neto, 2011). Por otra parte, los serovares más importantes transmitidos de animales a seres humanos y asociados a enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son: *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (OMS, 2018).

La enfermedad que ocasiona esta bacteria es la salmonelosis, definida como una patología infecciosa diarreica y sistémica, que afecta tanto humanos como animales, siendo de reporte obligatorio en algunos países. La notificación de casos y brotes permite dar un seguimiento al desarrollo de la enfermedad y así facilitar su control y prevención (OIE, 2018). En general, las entidades encargadas de la vigilancia y control de *Salmonella* sp recomiendan diferentes técnicas diagnósticas según las necesidades de cada laboratorio, el tamaño del muestreo, la procedencia y la precisión que se requiere para establecer un

diagnóstico. El aislamiento microbiológico mediante cultivo es uno de los métodos más usados debido a su sensibilidad, especificidad, economía y sencillez. El protocolo incluye una etapa de pre-enriquecimiento, seguido de enriquecimientos selectivos, y finalmente se debe confirmar bioquímicamente y serológicamente con antisueros O y H; sin embargo, estos métodos tardan hasta cinco días para generar un presunto aislamiento positivo y dos días más en dar un resultado verdaderamente positivo con pruebas bioquímicas confirmatorias (OIE, 2018). Adicionalmente, los protocolos microbiológicos no identifican los serovares (Dos Santos *et al.*, 2015).

Por otro lado, los métodos de diagnóstico han mejorado sustancialmente con el desarrollo de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación, las cuales son rápidas, sensibles, específicas y logran identificar la mayoría de las serovariedades, pero requieren equipos de mayor costo y operadores especializados que limitan su aplicación en entornos con recursos reducidos (Liu *et al.*, 2019). Otros métodos para el diagnóstico de *Salmonella* sp son los enzimo-inmunoanálisis (ELISA), la separación inmunomagnética (IMS), MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo, y el análisis por microchip, entre otros (OIE, 2018).

Según lo expuesto, es necesario recopilar información sobre las técnicas que se encuentran disponibles para el diagnóstico de *Salmonella* sp, que identifiquen verdaderos positivos y verdaderos negativos, y que se acomoden a los recursos disponibles y a las necesidades de cada laboratorio, dependiendo del tipo de muestra y otras variables que influyen en el diagnóstico. El objetivo de esta revisión sistemática fue proporcionar información sobre las técnicas microbiológicas y moleculares para la identificación de *Salmonella* sp que son utilizadas a nivel mundial, para ofrecer alternativas a los laboratorios de diagnóstico para optimizar resultados y así aportar a la toma de decisiones en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una búsqueda sistemática de artículos y trabajos de tesis sobre la identificación y técnicas diagnósticas de *Salmonella* sp a nivel global y publicados desde enero de 2015 hasta diciembre de 2021. La revisión incluyó técnicas moleculares y de secuenciación del genoma, pruebas serológicas y técnicas de cultivo tradicionales que abarcan la batería bioquímica y los cultivos selectivos. Los artículos se obtuvieron de seis bases de datos: NCBI/PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), -Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri?edit.scft=1>), SciELO - Scientific Electronic Library Online (<http://www.scielo.org/>), Google Scholar (<https://scholar.google.com/>) y Springer (<https://www.springer.com/la>).

En las búsquedas se excluyeron reseñas de libros, capítulos de libros, resúmenes de conferencias, enciclopedias, correspondencia, informes de patentes, comunicaciones cortas, ensayos clínicos, artículos con reportes de *Salmonella* sp desarrollada en humanos o resistencia antimicrobiana en especies de aves que no fueran galliformes.

El proceso de búsqueda y selección se realizó haciendo uso de palabras clave en la investigación y de conectores booleanos para construir ecuaciones de búsqueda, abarcando los criterios de inclusión. Algunos ejemplos de las ecuaciones de búsqueda fueron: ((poultry industry) AND (*invA* gene)) AND (PCR) AND (avian) AND (*salmonella*) AND (molecular detection); (((Poultry farm) AND (broiler)) AND (avian *salmonella*) AND (serotyping)) NOT (clinical). Para la selección e inclusión de los artículos que aportaron a la revisión sistemática se utilizó la metodología PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>).

Dado el impacto de *Salmonella* sp en la industria avícola y considerando el objetivo de esta revisión de alcance se abordaron las siguientes preguntas:

- ¿Cuáles son las técnicas microbiológicas y moleculares para la identificación de *Salmonella* sp en la industria avícola?
- ¿Cuál es la técnica más utilizada para la detección de salmonelosis aviar según los artículos que se encontraron en las diferentes bases de datos?
- ¿Qué protocolos de microbiología se han empleado en la identificación de *Salmonella* sp?
- ¿Cuáles genes se proponen para la identificación de *Salmonella* sp en aves en la identificación molecular?
- ¿Cuál es el origen de las muestras de los artículos revisados?
- ¿Cuál es la importancia del número de muestras analizadas en las diferentes técnicas de los artículos reportados?

RESULTADOS

Se identificaron 860 documentos en las seis bases de datos revisadas. De estos, 1.4% (n=12) fueron duplicados y se excluyeron dentro de la primera fase de identificación. Se revisó por título y Resumen/Abstract el 98.6% (848) restante. Se eliminó el 91.6% (n=777) según los criterios de exclusión iniciales, quedando 71 documentos (8.4%). Luego de revisarlos, 10 documentos tenían datos insuficientes, eran artículos o informes en aves que no describen el trabajo en la especie *G. gallus* o no eran relevantes en técnicas diagnósticas, de modo que solo 61 documentos cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para este estudio. La Figura 1 muestra los detalles del proceso de búsqueda en las bases de datos.

El análisis de los artículos incluidos y revisados mostró que el 24% (n=15) fue publicado en 2019, seguido de 2017 (20%, n=12) y 2018 (18%, n=11). Asimismo, la mayor parte de las publicaciones se hizo en revistas del

área de veterinaria con 42.6% (n=26), seguido del área de microbiología con 22.9% (n=14). En veterinaria, las investigaciones estuvieron dirigidas a la identificación y diagnóstico de *Salmonella* sp en la industria avícola (gallinas y pollos), enfocada en el control oportuno de las posibles enfermedades causadas por especies de *Salmonella* en las aves o que desencadenan enfermedad grave en el humano por la transmisión alimentaria.

Del total de artículos, el 41% fue realizado en Asia, 38% en las Américas, 18% en África y 3% en Europa, no habiéndose registrado estudios en Oceanía. En el continente asiático, el país que predominó fue China con 11 artículos. Asimismo, a nivel de Latinoamérica se obtuvieron 17 artículos de interés para el presente estudio.

Con base en los protocolos de microbiología encontrados en los 61 artículos revisados, 19.6% (n=12) realiza pre-enriquecimiento en agua peptonada incubando a 37 °C durante 18-24 h cuando las muestras provienen de un hisopo, y enriquecimiento selectivo en caldos de tetrionato (TT) y Rappaport-Vassiliadis (RV). Los medios líquidos se incuban durante 24 h a 42 °C. RV es un medio selectivo enriquecido con verde malaquita que inhibe el crecimiento de microorganismos distintos de *Salmonella* (Saravanan *et al.*, 2015; Alegria-Moran *et al.*, 2017; Reda *et al.*, 2019; Obe *et al.*, 2020).

Salmonella sp se puede aislar en medios selectivos y diferenciales como el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar *Salmonella* Shigella (SSA), agar Hektoen Entérico y agar MacConkey (Moraes *et al.*, 2016; De Carli *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2018; Khaltabadi *et al.*, 2019; Mthembu *et al.*, 2019; Zanetti *et al.*, 2019). El 37.7% (n=23) de las publicaciones hicieron uso de los medios selectivos y diferenciales ya mencionados para la identificación de las bacterias, aunque algunos autores emplearon estrictamente la metodología tradicional (8.19%, m=5) (Clemente *et al.*, 2015; Vaddella *et al.*,

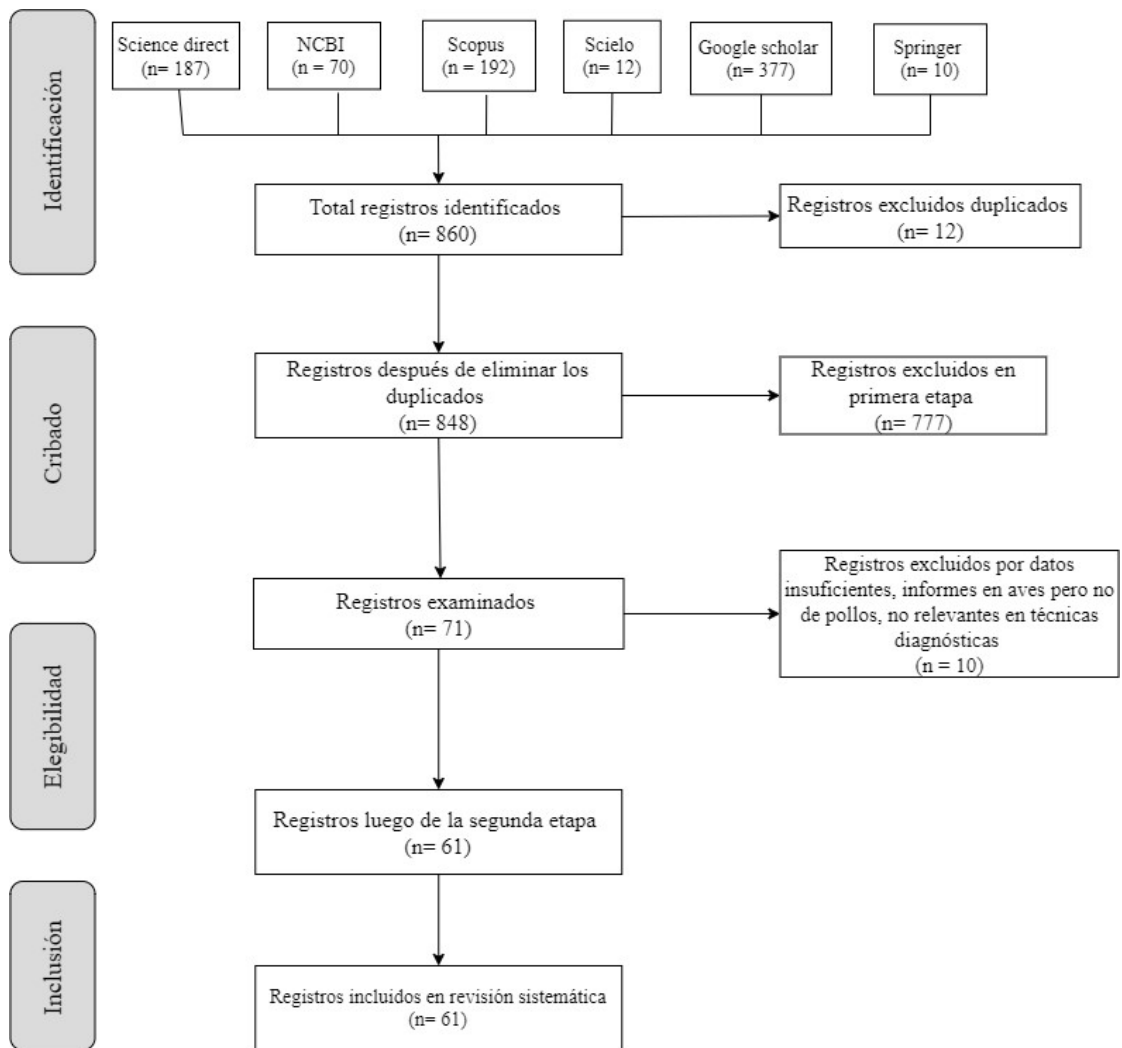


Figura 1. Diagrama del flujo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses - Elementos preferenciales para informar sobre revisiones sistemáticas y metanálisis) que describe las etapas de identificación, cribado, elegibilidad e inclusión de los artículos seleccionados en el estudio. Adaptado de Page *et al.* (2021)

2016; Kumar *et al.*, 2019), o combinaron la microbiología con técnicas moleculares (42.6%, n=26) (Soria *et al.*, 2017; Wajid *et al.*, 2019; Shehata *et al.*, 2020).

Asimismo, en 18% (n= 11) de los artículos se hizo uso de una batería bioquímica; lo cual ayuda a confirmar si las presuntas colonias son de *Salmonella* sp por medio de las reacciones metabólicas que presenta la

bacteria en los diferentes medios. En estos casos se hizo uso de agaros como los citados a continuación:

- Triple Azúcar Hierro (TSI): indica fermentación de glucosa y no fermentación de lactosa y/o agarosa; puede presentar o no fondo negro, indicando producción de H₂S (Tarabees *et al.*, 2017; Zanetti *et al.*, 2019).

- Agar Lisina Hierro (LIA): indica fermentación de glucosa y descarboxilación de lisina (Tarabees *et al.*, 2017).
- Agar Urea: determina si la bacteria hidroliza la urea (De Carli *et al.*, 2017; Alzwghaibi *et al.*, 2018).
- Agar Simons citrato: indica otra vía de obtención de energía, usando carbono como única fuente de energía (Saravanan *et al.*, 2015; Alegria-Moran *et al.*, 2017; Alzwghaibi *et al.*, 2018).
- Caldo triptófano: producción de indol (Saravanan *et al.*, 2015; Yokoyama *et al.*, 2015).
- Medio SIM: sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad (Donado-Godoy *et al.*, 2015; Yokoyama *et al.*, 2015).
- Caldos de fermentación para carbohidratos: maltosa, lactosa y sacarosa (Saravanan *et al.*, 2015).

El perfil bioquímico para los serovares de mayor importancia en el área avícola se describe en el Cuadro 1.

La prueba *gold standard* para la identificación de serovares de *Salmonella* sp es la serología, por medio de la metodología White-Kauffmann-Le Minor, que consta de una gama de antisueros que detectan los antígenos específicos de cada serovar de *Salmonella* sp (Alzwghaibi *et al.*, 2018; Xiong *et al.*, 2018; Sedeik *et al.*, 2019).

En los artículos que se incluyeron en la revisión sistemática, el 27.8% (n=17) emplearon la metodología White-Kauffmann-Le Minor para serotipificar, los artículos que emplearon serotipificación identificaron dos serovares: *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Tarabees *et al.*, 2017), mientras que los trabajos que combinaron serotipificación por White-Kauffmann-Le Minor con alguna técnica molecular (9.83%, n=6) caracterizaron serovares como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Panama*, *S. Lexington* y *S. Rissen* (Machado *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2015b; Zhao *et al.*, 2016). La Figura 2 muestra las publicaciones que se apoyaron en más de un tipo de técnica para identificar y caracterizar *Salmonella* sp.

Cuadro 1. Perfil bioquímico de los serovares Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum con sus biovares Gallinarum y Pullorum, que ayuda a identificar diferencias como motilidad o producción de H₂S entre serovares

Pruebas bioquímicas	Serovares			
	S. Gallinarum		S. Enteritidis	S. Typhimurium
	S. Gallinarum	S. Pullorum		
TSI (Agar-hierro-triple azúcar)	K/A ¹	K/A	K/A	K/A
LIA (Agar lisina hierro)	K/K ²	K/K	K/K	K/K
Urea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Simons citrato	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Caldo triptófano	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
H ₂ S	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
SIM ³	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Caldos	Maltosa	Negativo	Negativo	Positivo
	Lactosa	Negativo	Negativo	Negativo
	Sacarosa	Negativo	Negativo	Negativo

¹ K/A: Superficie alcalina/profundidad ácida: Microorganismo que solamente fermenta la glucosa

² K/K: Indica descarboxilación de la lisina, por ende, es un resultado positivo

³ SIM: producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), formación de indol y motilidad

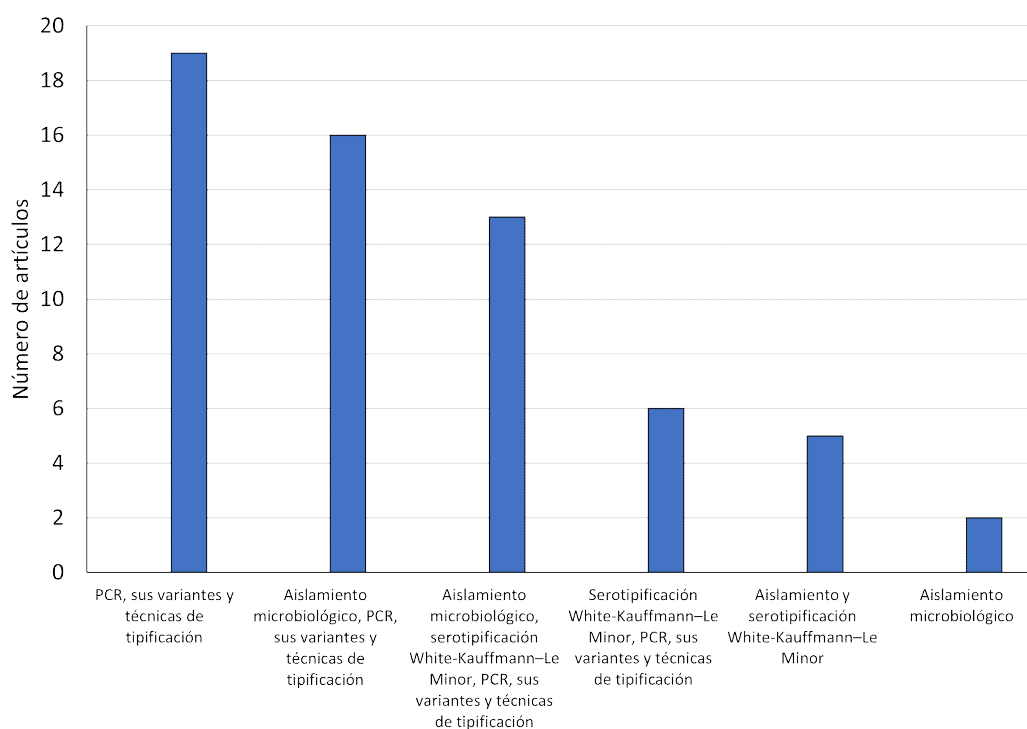


Figura 2. Técnicas de identificación y caracterización para *Salmonella* sp reportadas en 61 artículos científicos publicados entre 2015 y 2021

En el 88.5% (n=54) de los artículos emplearon herramientas moleculares, siendo PCR la técnica más empleada (72.1%). Algunos autores utilizaron variaciones de la PCR como la PCR multiplex (Ibrahim *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2018), PCR-tiempo real (qPCR) (Heymans *et al.* 2018) y Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias – PCR (ERIC-PCR Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR) (Zhao *et al.*, 2016) con 13.1, 8.1 y 1.6%, respectivamente. Para identificar y caracterizar los serovares de *Salmonella* sp se usó una amplia gama de genes específicos como el gen *invA* (Abd-Elghany *et al.*, 2015; Wajid *et al.*, 2019), *sepC* y *glgC* para biovares como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Zanetti *et al.*, 2019) (Ver Cuadro 2).

Como alternativa de la PCR se llevaron a cabo técnicas como amplificación isotérmica mediada por Loop (LAMP - Loop-Mediated Isothermal Amplification) (Liu *et al.*, 2019) y Amplificación por recombinasa y polimerasa (RPA - Recombinase Polymerase Amplification) (Liu *et al.*, 2017). Las técnicas de caracterización reportadas fueron la tipificación multilocus de secuencias (MLST - Multi-Locus Sequence Typing) (Wang *et al.*, 2020), ribotipificación (ISR - *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping) (De Carli *et al.*, 2017) y el análisis filogenético (Yokoyama *et al.*, 2015). También se empleó la electroforesis en campo pulsado (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis) (Saravanan *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2017; Ha *et al.*, 2018) con el fin de rastrear los serovares res-

Cuadro 2. Genes y cebadores reportados en artículos (n) por diversos autores para la identificación de *Salmonella* sp

Gen	n (%)	Utilidad del gen	Cebadores	Longitud (pb)	Referencia
<i>invA</i>	40 (65.5)	Específico de género, encargado de invasión de células epiteliales	TCATCGCACCGTCAAAGGAAC C GTGAAATTATCGCCACGTTCCG GGCAA	284	Ibrahim <i>et al.</i> (2016); Alzwghaibi <i>et al.</i> (2018); Villamil <i>et al.</i> (2020); Mkangara <i>et al.</i> (2020)
<i>hilA</i>	4 (6.5)	Regula los genes de virulencia tipo III o aparato de secreción, relacionados con invasión	ACTGTACGGACAGGGCTAT AGA CTC TCG GAT TGA ACC TGA	129	Villamil <i>et al.</i> (2020); Ramatla <i>et al.</i> (2020); Shang <i>et al.</i> (2019)
<i>fliC</i>	10 (16.4)	Codifica la flagelina del serovar Typhimurium	TATAGAATTCATGGCACAAGT CATTAAATAC TATATAAGCTTTTAACGCAGT AAAGAGAGG	NE	Mirhosseini <i>et al.</i> (2017); Alegria-Moran <i>et al.</i> (2017); Khaltabadi <i>et al.</i> (2019); Pereira <i>et al.</i> (2018)
<i>sefA</i>	6 (9.8)	Codifica el antígeno fimbrial SEF 14 del serovar Enteritidis	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGT AGC	488	Li <i>et al.</i> (2017); Alzwghaibi <i>et al.</i> (2018); Pereira <i>et al.</i> (2018)
<i>spvC</i>	8 (13.1)	Potencia la diseminación de <i>Salmonella</i> sp	ACTCCTTGACAACCAAATGC GGA TGTCTTCTGCATTTCCGCCACCA TCA	571	Pereira <i>et al.</i> (2018); Reda <i>et al.</i> (2019); Abd-Abd-Elghany <i>et al.</i> (2015); Mkangara <i>et al.</i> (2020)
<i>pefA</i>	4 (6.5)	Virulencia y adhesión	TTC CATTATTGCACTG GGTG AAGCCACTGCGAAAGATGCC	NE	Saravanan <i>et al.</i> (2015); Pereira <i>et al.</i> (2018); Zhang <i>et al.</i> (2018)
<i>speC</i>	6 (9.8)	Pseudogen en los serovares Gallinarum y Pullorum	NE	NE	Zhao <i>et al.</i> (2016); De Carli <i>et al.</i> (2017); Khaltabadi <i>et al.</i> (2019)
<i>glgC</i>	3 (4.9)	Único para serovar Gallinarum	GATCTGCTGCCAGCTCAA GCGCCCTTTTCAAAAACATA	174	Zanetti <i>et al.</i> (2019)

NE: No especifica

ponsables de los brotes, diferenciar entre serovares patógenos y establecer la relación genética de los serovares para construir la filogenia (Wang *et al.*, 2020).

Con las herramientas moleculares, especialmente con la PCR y sus variantes y con las técnicas de tipificación multilocus como MLST, PFGE e ISR se identificaron serovares como *S. Typhimurium*, *S.*

Heidelberg, *S. Bongori*, *S. Enteritidis*, *S. Paratyphi* y *S. Newport* (Ramatla *et al.*, 2020), *S. Kentucky* (Tasmin *et al.* 2017), *S. Schwarzengrund* (Moraes *et al.* 2016), *S. Hvittingfoss* y *S. Muenster* (Rodríguez *et al.*, 2015a), *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (Ren *et al.*, 2017). El serovar más frecuente identificado con herramientas moleculares fue *S. Typhimurium* (47.5%, n=29) seguido de *S. Enteritidis* (39.3%, n=24).

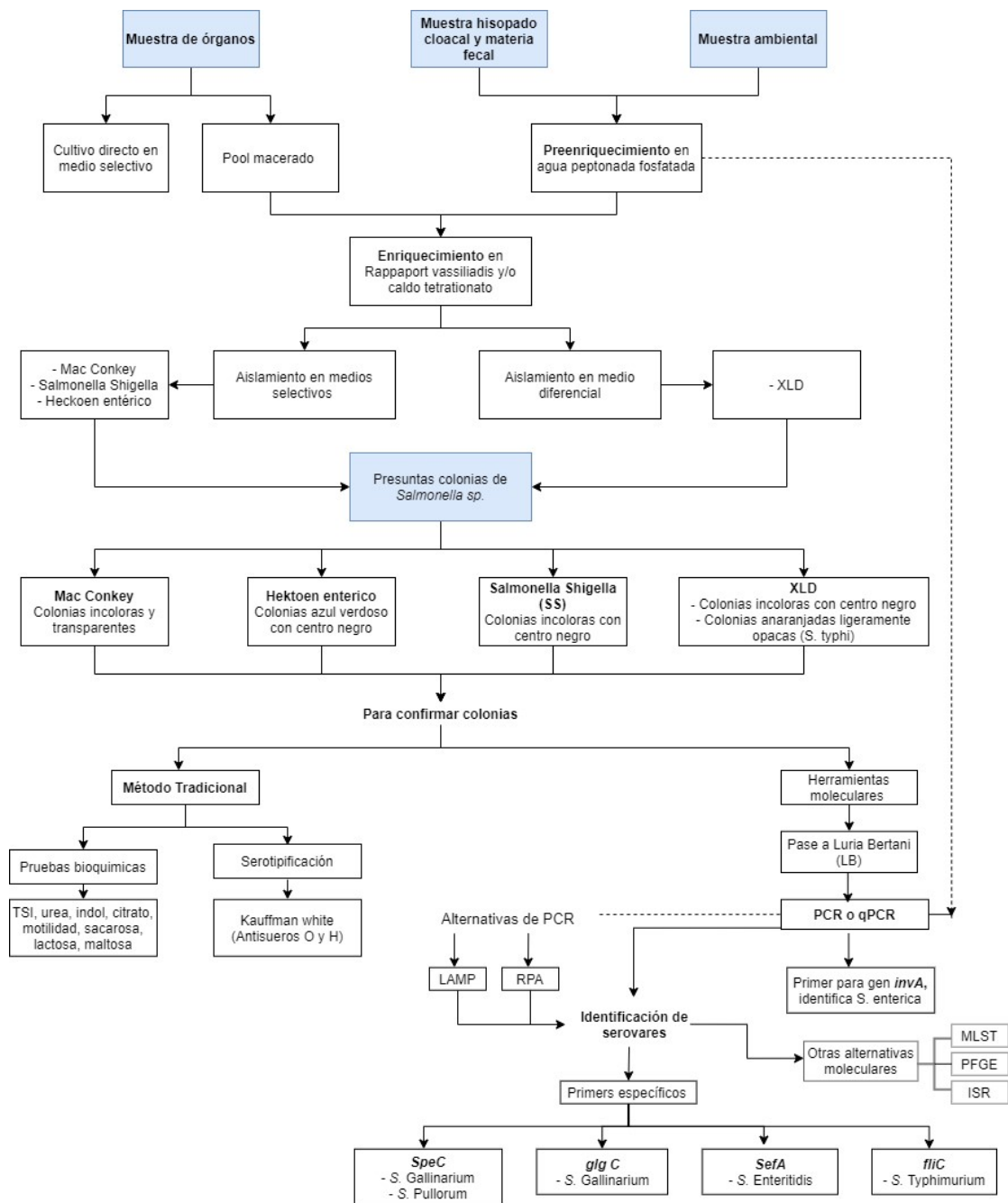


Figura 3. Protocolo de identificación y caracterización para *Salmonella* sp a partir de muestras ambientales, hisopados cloacales, heces y órganos de aves (*Gallus gallus*) obtenidas en granjas avícolas. LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification; RPA: Recombinase Polymerase Amplification; MLST: Multi-Locus Sequence Typing; PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis; ISR: *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping

El tipo de producción incluido en esta investigación abarcó pollos de engorde (21.3%, n=13), ponedoras (8.2, n=5) y reproductoras (8.2%, n=5), mientras que en el 62.3% (n=38) de los estudios no especificaron el tipo de ave. El serovar más frecuente en pollos de engorde fue Enteritidis (muestras fecales) (Zhao *et al.*, 2016), y Typhimurium y Kentucky en canales de pollos de engorde (Tasmin *et al.*, 2017). Por otra parte, los serovares encontrados con mayor frecuencia en las aves ponedoras fueron Schwarzengrund y Enteritidis aislados de la cáscara del huevo, albúmina y la yema (Moraes *et al.*, 2016). Asimismo, Im *et al.* (2015) encontraron serovares menos comunes en heces, polvo y cáscaras de huevo de aves ponedoras (*S. Bareilly*, *S. Mbandaka*, *S. Rissen*). En forma similar, en muestras de reproductoras se encontraron los serovares *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* que fueron aislados de huevo y de hisopado cloacal (Gómez *et al.*, 2015).

El tipo de muestra para la identificación de *Salmonella* sp fue muy variable. Entre las muestras de tejidos (n=9) se utilizó preferentemente el huevo (cáscara, albúmina y yema) y en las muestras ambientales (n=11) (Saravanan *et al.*, 2015; Wajid *et al.*, 2019) se utilizó mayormente el hisopado de arrastre. En las muestras alimentarias se utilizaron partes de aves como alas, pechugas y muslos (Park y Rieke, 2015; Abd-Elghany *et al.*, 2015; Tarabees *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2020). Por otro lado, en 10 estudios (Kumar *et al.*, 2019; Zanetti *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020) se empleó directamente aislamientos bacterianos para trabajar con serotipificación, PCR y ELISA. En 20 estudios se trabajó con vísceras como intestino, hígado, riñón, saco vitelino y bazo (Gómez *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016).

Un punto importante de analizar es el número de muestras utilizadas en los estudios. De los 61 artículos, 75.4% (n=46) tomaron 100 o más muestras, mientras que 24.5% (n=15) tomaron menos de 100 muestras o no especificaron el tamaño de la muestra.

Posterior a la revisión y análisis de las técnicas reportadas, se elaboró una guía de identificación y caracterización para *Salmonella* sp. Se partió del tipo de muestras que se pueden tomar en avicultura: a) muestras ambientales (hisopos de arrastre, muestras de polvo, ropa de trabajadores, muestras directas de galpones, reservas de agua y alimento para los pollos); b) hisopados cloacales y heces secas y c) muestras de órganos (huevos o vísceras) (Machado *et al.*, 2017). Se debe considerar que, en las muestras ambientales, de huevos o de heces solo se puede recuperar salmonellas no tifoideas, mientras que en las muestras obtenidas de órganos *post mortem* se recuperan las salmonellas tifoideas (*S. Gallinarum* y *S. Pullorum*). A partir de las muestras ambientales e hisopados cloacales se realiza un pre-enriquecimiento no selectivo en agua peptonada a 37 °C durante 18-20 h, luego se realiza un enriquecimiento selectivo en caldo o agar semisólido de TT y RV a 42 °C durante 18-24 h (Saravanan *et al.*, 2015), y se continua con la etapa de aislamiento en medios selectivos y diferenciales, observando las características bioquímicas de las cepas aisladas. Entre los medios más utilizados se encuentra MacConkey, Hektoen Entérico, Salmonella Shigella y XLD, que se incuban a 37 °C durante 18-24 h (Soria *et al.*, 2017)

Para confirmar las presuntas colonias de *Salmonella* sp se tienen dos protocolos. El primero consiste en la metodología tradicional, realizando la batería bioquímica básica, seguido de la serotipificación con el esquema White-Kauffmann-Le Minor. La segunda metodología consiste en aplicar herramientas moleculares como la PCR. Para esto último es preferible tener células bacterianas viables en un medio de cultivo líquido como el Luria Bertani (LB) para facilitar la extracción de ADN, dado que no contiene inhibidores de la PCR. Los cebadores específicos que se requieren en la PCR permiten determinar algunos de los serovares de *Salmonella* sp, al igual que las técnicas de tipificación molecular como MLST, ISR o PFGE (Ver Figura 3)

DISCUSIÓN

Las técnicas tradicionales basadas en la microbiología y serotipificación prevalecen como el *gold standard* debido a su practicidad, bajo costo y sensibilidad (Moraes *et al.*, 2016). Además, se reconoce que la mayoría de los laboratorios prefieren realizar pre-enriquecimiento, enriquecimiento y aislamiento antes de pasar a técnicas moleculares como la PCR (Ramatlá *et al.*, 2020). El pre-enriquecimiento permite restaurar las bacterias dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable (Wajid *et al.*, 2019) y el enriquecimiento aporta en la selectividad creciente del patógeno. Cabe aclarar que dentro de las técnicas microbiológicas, los medios selectivos y diferenciales son de gran ayuda para la identificación de colonias, pero requieren tiempo, ya que tardan hasta cinco días en dar un resultado (Ibrahim *et al.*, 2016). Por otro lado, la extracción del ADN para su uso en PCR puede ser complicado cuando se usan medios de cultivo que contienen inhibidores como sales biliares y rojo de fenol en el caso del medio XLD, por lo que debe hacerse un pase intermedio a medios que no contengan inhibidores de la PCR antes de proceder a la extracción del ADN. Aun así, los medios selectivos más utilizados en las publicaciones revisadas fueron XLD y MacConkey (Donado-Godoy *et al.*, 2015; Sedeik *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020) para la identificación de *Salmonella* sp.

La metodología White-Kauffmann-Le Minor es sensible para subtipificar los diferentes aislamientos según su serovariedad, habiéndose descrito cerca de 2600 serotipos con este esquema (Lozano-Villegas *et al.*, 2019). Esto ha sido posible gracias a la identificación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) presentes en la pared celular de *Salmonella* sp (Alzweghaibi *et al.*, 2018). No obstante, la serotipificación es un proceso costoso y laborioso, que no identifica el serovar con la fase flagelar como *S. enterica* serovar Gallinarum y no distingue entre las

serovariedades de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Xiong *et al.* 2018). Los anterior es un problema para la industria avícola ya que estos biovars son los causantes de la fiebre tifoidea aviar y la pulorosis aviar.

En la presente revisión, técnicas moleculares como PCR multiplex y PCR convencional fueron las más utilizadas. La PCR multiplex es una herramienta prometedora para el diagnóstico clínico al tener una alta sensibilidad y especificidad en los resultados (Xin *et al.*, 2021). También, amplifica secuencias específicas y discrimina en forma simultánea a microorganismos, cepas y serotipos (Mthembu *et al.*, 2019). En contraparte, tiene la desventaja de requerir una gran cantidad de cebadores, lo cual aumenta el riesgo de un alineamiento incorrecto (Li *et al.*, 2017). La PCR convencional amplifica solo una región del ADN, limitando su uso (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2021). El poder discriminatorio de esta técnica está basado en el tamaño del cebador y su especificidad depende de los cebadores empleados (Soria *et al.*, 2017).

Otra limitación que presenta el PCR multiplex y PCR convencional es el requerimiento de procesarla luego de una PCR para visualizar los productos por medio de electroforesis (Ha *et al.* 2018). Por otro lado, dada la elevada sensibilidad y especificidad de la qPCR, se puede identificar *Salmonella* sp en muestras con escasa cantidad de ADN (Park y Ricke, 2015). logrando amplificar y detectar los productos en una misma etapa (Moraes *et al.*, 2016). Aun así, una limitación de esta técnica es el uso de tres dianas (dos cebadores y las sondas) que sean conservadas, ya que una mutación en cualquier segmento impedirá la detección de alguna variante (Nova *et al.*, 2017).

Otras técnicas reportadas basadas en los principios de la biología molecular para realizar la caracterización de *Salmonella* sp fueron: ERIC-PCR, técnica económica y sencilla, que permite tipificar y discriminar serotipos estrechamente relacionados (Sedeik

et al., 2019), así como las técnicas de amplificación isotérmica como RPA y LAMP, las cuales no requieren de extracción de ADN y presentan alta sensibilidad, robustez, rapidez y automatización (Liu *et al.*, 2019). De igual manera, ISR y MLST son empleadas para tipificar aislados de *Salmonella* sp permitiendo el seguimiento filogenético (Guard *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020), además de PFGE que es una técnica discriminatoria y reproducible, útil en los estudios de seguimiento epidemiológico para identificar serovares o cepas estrechamente relacionadas (Voss-Rech *et al.*, 2015). No obstante, estas técnicas fueron muy poco utilizadas en las publicaciones revisadas, ya que los autores consideran como limitantes la falta de protocolos estandarizados y la capacitación del personal (Li *et al.*, 2017), además de los costos de los equipos (Kubo *et al.*, 2020).

En los 61 artículos revisados, el gen *invA* (Abd-Elghany *et al.*, 2015) fue el más utilizado para la identificación de *S. enterica*, ya que es específico de este género, aunque no permite la discriminación de serovares. Asimismo, en la revisión se detectaron dos genes utilizados para identificar *Salmonella* sp, que van más dirigidos a sus mecanismos de virulencia: *hilA* (Shang *et al.*, 2019) y *spv* (Vidic *et al.*, 2017). Los otros genes que se destacaron en la identificación de serovares específicos de *S. enterica* fueron *speC* para *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Alzwwghaibi *et al.*, 2018), *glgC* para *S. Gallinarum* (De Carli *et al.*, 2017), *fliC* que codifica la flagelina de *S. Typhimurium* (Khaltabadi *et al.*, 2019) y *sefA* que codifica el antígeno fimbrial de *S. Enteritidis* (Alzwwghaibi *et al.*, 2018).

A pesar de que el *gold standard* para la identificación y caracterización de *Salmonella* sp en la industria avícola sigue siendo la microbiología y la serotipificación, la mayoría de los países ha implementado PCR y sus variantes. Sin embargo, implementar herramientas moleculares de rutina

en los laboratorios es un reto para algunos países, ya que a pesar del bajo costo que tiene procesar las muestras con biología molecular, equipar un laboratorio con los instrumentos necesarios para llevar a cabo estas nuevas tecnologías es costoso. Adicionalmente, lograr estandarizar un ensayo en la mayoría de los laboratorios toma tiempo y trabajo.

CONCLUSIONES

- Es esencial que en la industria avícola existan técnicas capaces de identificar los serovares de *Salmonella* sp causantes de enfermedad en aves de corral y en humanos.
- La serotipificación por White-Kauffmann-Le Minor es el *gold standard* para caracterizar las serovariedades de *Salmonella* sp; sin embargo, esta técnica puede ser costosa y laboriosa, de allí que las técnicas moleculares permiten caracterizar los serovares de *Salmonella* sp de una forma más sencilla y con mayor sensibilidad.
- Las técnicas moleculares más empleadas por los autores son PCR convencional y PCR multiplex, donde la especificidad de los cebadores permite identificar y caracterizar genes específicos de los serovares de *Salmonella* sp, obteniendo resultados más sensibles, específicos y rápidos.
- La PCR y PCR multiplex se pueden realizar a partir de resuspensión de células bacterianas viables de aislamientos en medios selectivos, de allí que se sigue requiriendo el uso de técnicas microbiológicas.
- Las herramientas moleculares presentan una gran ventaja frente a los métodos tradicionales, ya que estas técnicas de identificación genotípica permiten diferenciar serovares fenotípicamente similares.

LITERATURA CITADA

1. **Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T. 2015.** Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect* 143: 997-1003. doi: 10.1017/S0950268814001708
2. **Alegria-Moran R, Rivera D, Toledo V, Moreno-Switt AI, Hamilton-West C. 2017.** First detection and characterization of *Salmonella* spp in poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. *Epidemiol Infect* 145: 3180-3190. doi: 10.1017/S0950268817002175
3. **Alzweghaibi AB, Yahyaraeyat R, Fasaei BN, Langeroudi AG, Salehi TZ. 2018.** Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. *Arch Microbiol* 200: 1009-1016. doi: 10.1007/s00203-018-1501-7
4. **Barrow PA, Freitas Neto OC. 2011.** Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol* 40: 1-13. doi: 10.1080/03079457.2010.542575
5. **Clemente L, Manageiro V, Jones-Dias D, Correia I, Themudo P, Albuquerque T, Geraldés M, et al. 2015.** Antimicrobial susceptibility and oxyminon-â-lactam resistance mechanisms in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from different animal sources. *Res Microbiol* 166: 574-583. doi: 10.1016/j.resmic.2015.05.007
6. **De Carli S, Gräf T, Kipper D, Lehmann FKM, Zanetti N, Siqueira FM, Cibulski S, et al. 2017.** Molecular and phylogenetic analyses of *Salmonella* Gallinarum trace the origin and diversification of recent outbreaks of fowl typhoid in poultry farms. *Vet Microbiol* 212: 80-86. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.001
7. **Donado-Godoy P, Byrne BA, Hume M, León M, Pérez-Gutiérrez E, Vives Flores MJ, Clavijo V, et al. 2015.** Molecular characterization of *Salmonella paratyphi* B dT+ and *Salmonella* Heidelberg from poultry and retail chicken meat in Colombia by pulsed-field gel electrophoresis. *J Food Prot* 78: 802-807. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-356
8. **Dos Santos L, Ligiani M, Marcieli M, Parizotto L, Rodrigues LB, do Nascimento V, dos Santos L. 2015.** Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp em abatedouros de frangos de corte. *Pesqui Vet Brasil* 35: 223-229.
9. **Guard J, Sánchez R, Morales C, Stewart T, Liljebjelke K, Van J, Ingram K, et al. 2012.** Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica* FEMS *Microbiol Lett* 337: 61-72. doi: 10.1111/1574-6968.12010
10. **Gómez JE, Vanegas CA, Dalmau EA, Díaz CA, Sánchez ME, Santos RE, et al. 2015.** Identificación y prevalencia de *Salmonella* Pullorum, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* por técnicas bioquímicas y estandarización de técnicas moleculares en el ciclo completo de producción de pollo de engorde en Cundinamarca. [Internet]. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/view-content.cgi?article=1016&context=libros#page=153>
11. **Ha JS, Seo KW, Kim YB, Kang MS, Song CS, Lee YJ. 2018.** Prevalence and characterization of *Salmonella* in two integrated broiler operations in Korea. *Irish Vet J* 71: 3. doi: 10.1186/s13620-018-0114-4
12. **Heymans R, Vila A, van Heerwaarden CAM, Jansen CCC, Castelijin GAA, van der Voort M, Biesta-Peters EG. 2018.** Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis

- by multiplex quantitative PCR. PLoS One 13: e0206316. doi: 10.1371/journal.pone.0206316
13. **Ibrahim HM, El-Moaty DA, Ahmed HA, El-Enbaawy MI. 2016.** Phenotypic and genotypic characterization of locally isolated *Salmonella* strains used in preparation of *Salmonella* antigens in Egypt. Vet World 9: 1435-1439. doi: 10.14202/vetworld.2016.1435-1439
 14. **Im MC, Jeong SJ, Kwon YK, Jeong OM, Kang MS, Lee YJ. 2015.** Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp isolated from commercial layer farms in Korea. Poultry Sci 94: 1691-1698. doi: 10.3382/ps/pev137
 15. **Khaltabadi RF, Shahrokhi N, Ebrahimi-Rad M, Ehsani P. 2019.** *Salmonella* Typhimurium in Iran: contribution of molecular and IS200 PCR methods in variants detection. PLoS One 14: e0213726. doi: 10.1371/journal.pone.0213726
 16. **Kubo I, Kajiya M, Aramaki N, Furutani S. 2020.** Detection of *Salmonella enterica* in egg yolk by PCR on a microfluidic disc device using immunomagnetic beads. Sensors (Basel) 20: 1060. doi: 10.3390/s20041060
 17. **Kauffman S. 1961.** LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. [Internet]. Available in: <https://www.bacterio.net/genus/salmonella>
 18. **Kumar Y, Singh V, Kumar G, Gupta NK, Tahlan AK. 2019.** Serovar diversity of *Salmonella* among poultry. Indian J Med Res 150: 92-95. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1798_17
 19. **Li X, Liu L, Li Q, Xu G, Zheng J. 2017.** *Salmonella enteritidis* in layer farms of different sizes located in northern China: on-farm sampling and detection by the PCR method. Braz J Poult Sci 19: 377-386. doi: 10.1590/1806-9061-2016-0318
 20. **Liu HB, Zang YX, Du XJ, Li P, Wang S. 2017.** Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria. J Dairy Sci 100: 7016-7025. doi: 10.3168/jds.2017-12566
 21. **Liu Z, Zhang Q, Yang NN, Xu MG, Xu JF, Jing ML, Wu WX, et al. 2019.** Rapid and sensitive detection of *Salmonella* in chickens using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. J Microbiol Biotechnol 29: 454-464. doi: 10.4014/jmb.1712.12010
 22. **Lozano-Villegas K, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán I. 2019.** Effectiveness of six molecular typing methods as epidemiological tools for the study of *Salmonella* isolates in two Colombian regions. Vet World 12: 1998-2006. doi: 10.14202/vetworld.2019.1998-2006
 23. **Machado SC, Pereira VL, Aquino MH, Giombeli A, Rodrigues D, Nascimento E. 2020.** Qualitative and quantitative analysis of *Salmonella* spp in broilers technological processing and determination of a performance objective (PO) for frozen chicken breast. Braz J Poult Sci 22: 1-12. doi: 10.1590/1806-9061-2019-1196
 24. **Machado SC, Pereira VL, Aquino MH, Santos AF, Rodrigues DP, Giombelli A, Nascimento. 2017.** ER. Serotyping and genotyping of *Salmonella* strains isolated from broilers, chicken carcasses before and after chilling, and frozen chicken breasts produced in the states of Mato Grosso Do Sul and Santa Catarina, Brazil. Braz J Poult Sci 19: 135-142. doi: 10.1590/1806-9061-2016-0371
 25. **Mirhosseini SA, Fooladi AAI, Amani J, Sedighian H. 2017.** Production of recombinant flagellin to develop ELISA-based detection of *Salmonella* Enteritidis. Braz J Microbiol 48: 774-781. doi: 10.1016/j.bjm.2016.04.033
 26. **Mkangara M, Mbega ER, Chacha M. 2020.** Molecular identification of *Salmonella typhimurium* from village chickens based on *inva* and *spvC* genes. Vet World 13: 764-767. doi: 10.14202/vetworld.2020.764-767

27. **Moraes DM, Duarte SC, Bastos TS, Rezende LS, Leandro NS, Café MB, Stringhini JH, et al. 2016.** Detection of *Salmonella* spp by conventional bacteriology and by quantitative polymerase-chain reaction in commercial egg structures. *Braz J Poult Sci* 18: 117-124. doi: 10.1590/18069061-2015-0063
28. **Mthembu TP, Zishiri OT, El Zowalaty ME. 2019.** Detection and molecular identification of salmonella virulence genes in livestock production systems in South Africa. *Pathogens* 8: 124. doi: 10.3390/pathogens8030124
29. **Nova P de, Gómez M, Miranda R, Carvajal A. 2017.** Desventajas de la PCR a tiempo real respecto a la PCR convencional en el diagnóstico vírico. En: XXII Simposio Avedila. España.
30. **Obe T, Nannapaneni R, Schilling W, Zhang L, McDaniel C, Kiess A. 2020.** Prevalence of *Salmonella enterica* on poultry processing equipment after completion of sanitization procedures. *Poultry Sci* 99: 4539-4548. doi: 10.1016/j.psj.2020.05.043
31. **[OIE] World Organisation for Animal Health. 2018.** Salmonellosis. En: Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres. [Internet]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
32. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2018.** Salmonella (No tifoidea). [Internet]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
33. **Page M, Moher D, Bossuyt P, Boutron I, Hoffmann T, Mulrow C, Shamseer L, Tetzlaff J, et al. 2021.** PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021: 372. doi: 10.1136/bmj.n160
34. **Park SH, Ricke SC. 2015.** Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Salm. enteritidis*, *Salm. heidelberg* and *Salm. typhimurium*. *J Appl Microbiol* 118: 152-160. doi: 10.1111/jam.12678
35. **Pereira J, Soares V, Tadielo L, Rodrigues dos Santos E, Lopes G, Payão D, Duval E, da Silva W. 2018.** Foods introduced into Brazil through the border with Argentina and Uruguay: pathogen detection and evaluation of hygienic-sanitary quality. *Int J Food Microbiol* 283: 22-27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.013
36. **Ramatla TA, Mphuthi N, Ramaili T, Taioe MO, Thekiso OMM, Syakalima M. 2020.** Molecular detection of virulence genes in *Salmonella* spp isolated from chicken faeces in Mafikeng, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 91: e1-e7. doi: 10.4102/jsava.v91i0.1994
37. **Reda FM, Mohamed I, Abdel-Shafi S. 2019.** Potential control of *Salmonella* spp isolated from different environmental sources by combined mixture of henna, garlic and onion extracts. *Biocatal Agric Biotechnol* 22: 101350. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101350
38. **Ren X, Fu Y, Xu C, Feng Z, Li M, Zhang L, Zhang J, Liao M. 2017.** High resolution melting (HRM) analysis as a new tool for rapid identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum. *Poultry Sci* 96: 1088-1093. doi: 10.3382/ps/pew400
39. **Rodríguez-Hernández R, Bernal JF, Cifuentes JF, Fandiño LC, Herrera-Sánchez MP, Rondón-Barragán I, Verjan Garcia N. 2021.** Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* isolated from broiler farms at the Tolima region - Colombia. *Animals* 11: 970. doi: 10.3390/ani11040970
40. **Rodríguez JM, Rondón IS, Verjan N. 2015a.** Serotypes of *Salmonella* in broiler carcasses marketed at Ibagué, Colombia. *Braz J Poult Sci* 17: 545-552. doi: 10.1590/1516-635X1704545-552
41. **Rodríguez R, Fandiño C, Donado P, Guzmán L, Verjan N. 2015a.** Characterization of *Salmonella* from commercial egg-laying hen farms in a central

- region of Colombia. *Avian Dis* 59: 57-63. doi: 10.1637/10873-052714-reg
42. **Saravanan S, Purushothaman V, Murthy TR, Sukumar K, Srinivasan P, Gowthaman V, Balusamy M, et al. 2015.** Molecular epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* in poultry and poultry products in India: implications for human health. *Indian J Microbiol* 55: 319-326. doi: 10.1007/s12088-015-0530-z
 43. **Sedeik ME, El-Shall NA, Awad AM, Elfeky SM, Abd El-Hack ME, Hussein EOS, Alowaimer AN, et al. 2019.** Isolation, conventional and molecular characterization of *Salmonella* spp. from newly hatched broiler chicks. *AMB Express* 9: 136. doi: 10.1186/s13568-019-0821-6
 44. **Shang K, Wei B, Jang HK, Kang M. 2019.** Phenotypic characteristics and genotypic correlation of antimicrobial resistant (AMR) *Salmonella* isolates from a poultry slaughterhouse and its downstream retail markets. *Food Control* 100: 35-45. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.12.046
 45. **Shehata AA, Basiouni S, Elrazek AA, Sultan H, Tarabees R, Abd MS, Elsayed E, et al. 2018.** Characterization of *Salmonella enterica* isolated from poultry hatcheries and commercial broiler chickens. *Pak Vet J* 11: 314-319. doi: 10.29261/pakvetj/2019.033
 46. **Soria MC, Soria MA, Bueno DJ, Godano EI, Gómez SC, ViaButron IA, Padin VM, Rogé AD. 2017.** *Salmonella* spp contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. *Poultry Sci* 96: 2820-2830. doi: 10.3382/ps/pex053
 47. **Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. 2009.** Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathog Dis* 6: 407-415. doi: 10.1089/fpd.2008.0213
 48. **Tarabees R, Elsayed MSA, Shawish R, Basiouni S, Shehata AA. 2017.** Isolation and characterization of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from chicken meat in Egypt. *J Infect Dev Countr* 11: 314-319. doi: 10.3855/jidc.8043
 49. **Tasmin R, Hasan NA, Grim CJ, Grant A, Choi SY, Alam MS, Bell R, et al. 2017.** Genotypic and phenotypic characterization of multidrug resistant *Salmonella typhimurium* and *Salmonella kentucky* strains recovered from chicken carcasses. *PLoS One* 12: e0176938. doi: 10.1371/journal.pone.0176938
 50. **Vaddella V, Pitesky M, Cao W, Govinthasamy V, Shi J, Pandey P. 2016.** Assessing *Salmonella typhimurium* persistence in poultry carcasses under multiple thermal conditions consistent with composting and wet rendering. *Poultry Sci* 95: 705-714. doi: 10.3382/ps/pev373
 51. **Vidic J, Manzano M, Chug-Ming C, Jaffrezic-Renault N. 2017.** Advanced biosensors for detection of pathogen related to livestock and poultry. *J Vet* 48: 11. doi: 10.1186/s13567-017-0418-5
 52. **Villamil C, Calderon MN, Arias MM, Leguizamon JE. 2020.** Validation of droplet digital polymerase chain reaction for *Salmonella* spp quantification. *Front Microbiol* 11: 1512. doi: 10.3389/fmicb.2020.01512
 53. **Voss-Rech D, Vaz CS, Alves L, Coldebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. 2015.** A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Sci* 94: 433-441. doi: 10.3382/ps/peu081
 54. **Wajid M, Saleemi MK, Sarwar Y, Ali A. 2019.** Detection and characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis as an emerging threat in poultry farms of Faisalabad, Pakistan. *J Appl Microbiol* 127: 248-261. doi: 10.1111/jam.14282

55. **Wang J, Li J, Liu F, Cheng Y, Su J. 2020.** Characterization of *Salmonella enterica* isolates from diseased poultry in northern China between 2014 and 2018. *Pathogens* 9: 95. doi: 10.3390/pathogens9020095
56. **Xin S, Zhu H, Tao C, Zhang B, Yao L, Zhang Y, Apôtre DJ. 2021.** Rapid detection and differentiating of the predominant *Salmonella* serovars in chicken farm by TaqMan Multiplex Real-Time PCR assay. *Front Cell Infect Microbiol* 11: 759965. doi: 10.3389/fcimb.2021.759965
57. **Xiong D, Song L, Pan Z, Jiao X. 2018.** Identification and discrimination of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovars pullorum and gallinarum based on a one-step multiplex PCR assay. *Front Microbiol* 9: 1718. doi: 10.3389/fmicb.2018.01718
58. **Yokoyama E, Ando N, Ohta T, Kanada A, Shiwa Y, Ishige T, Murakami K, et al. 2015.** A novel subpopulation of *Salmonella enterica* serovar Infantis strains isolated from broiler chicken organs other than the gastrointestinal tract. *Vet Microbiol* 175: 312-318. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.11.024
59. **Zanetti NS, De Carli S, Souza MN, Lehmann FKM, Kipper D, Dias KK, Fonseca AS, et al. 2019.** Molecular detection and characterization of *Salmonella gallinarum* from poultry farms in Brazil. *J Appl Poult Res* 28: 1335-1341. doi: 10.3382/japr/pfz051
60. **Zhang D, Zhuang L, Wang C, Zhang P, Zhang T, Shao H, Han X, Gong J. 2018.** Virulence gene distribution of *Salmonella* Pullorum isolates recovered from chickens in China (1953-2015). *Avian Dis* 62: 431-436. doi: 10.1637/11927-071318-ResNote.1
61. **Zhao X, Gao Y, Ye C, Yang L, Wang T, Chang W. 2016.** Prevalence and characteristics of *Salmonella* isolated from free-range chickens in Shandong province, China. *Biomed Res Int* 2016: 8183931. doi: 10.1155/2016/8183931