

Caracterización de serovares no tifoideos de *Salmonella enterica* de origen humano y aviar mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) de Lima, Perú

Characterization of non-typhoid *Salmonella enterica* serovars of human and avian origin by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) from Lima, Peru

André F. Sedano Sánchez^{1*}, Ronnie G. Gavilán Chávez^{2,3}, Juan Siuce¹,
Paul Fernández-Castro^{2,4}, Sonia Y. Calle Espinoza¹

RESUMEN

En el Perú se vienen reportando serovares de *Salmonella* no tifoidea (SNT) en casos humanos que estarían relacionados a los hallados en huevos comerciales, carcasas de broilers y subproductos. El presente estudio tuvo como objetivo determinar mediante el porcentaje de similaridad de los perfiles genéticos de los serovares de SNT aislados de humanos y productos aviares mediante la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE). Se obtuvieron 49 aislados bacterianos de serovares de SNT de casos clínicos humanos y productos aviares (huevos, carcasa de broilers, vísceras, cama de ave), que se analizaron mediante PFGE. Con el programa bioinformático Bionumerics v. 7.0 se generó un dendrograma que muestra la relación *Xba*I – perfiles PFGE. El análisis de las bandas generadas se realizó mediante el uso del Método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGM) para evaluar la diversidad genética de los aislados. Se estableció como valor de corte 90% de similaridad entre los pulsotipos para establecer posibles

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú

³ Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Privada San Juan Bautista, Lima, Perú

⁴ Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas, Perú

* Autor de correspondencia: André Sedano Sánchez; andresedanos@gmail.com

Recibido: 30 de junio de 2024

Aceptado para publicación: 8 de septiembre de 2024

Publicado: 31 de octubre de 2024

©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

relaciones. Se encontró que algunos aislados de origen humano y aviar de *Salmonella* Typhimurium, Kentucky e Infantis poseen pulsotipos idénticos lo que indica que los aislados corresponden a un mismo clon circulando entre humanos y productos aviares.

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

ABSTRACT

In Peru, non-typhoidal *Salmonella* (NTS) serovars have been reported in human cases that could be related to those found in commercial eggs, broiler carcasses and by-products. The present study aimed to determine the percentage the genetic profiles similarity of NTS serovars isolated from humans and poultry products using Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Forty-nine bacterial isolates of NTS serovars were obtained from human clinical cases and poultry products (eggs, broiler carcasses, viscera, poultry litter), which were analysed by PFGE. A dendrogram showing the XbaI – PFGE profiles relationship was generated using the Bionumerics v. 7.0 bioinformatics program. The analysis of the generated bands was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGM) to evaluate the genetic diversity of the isolates. A cut-off value of 90% similarity between the pulsotypes was used to establish possible relationships. It was found that some isolates of *Salmonella* Typhimurium, Kentucky and Infantis from human and avian origin have identical pulsotypes, indicating that the isolates correspond to the same clone circulating between humans and avian products.

Key words: *Salmonella*, humans, commercial eggs, broiler chicken, PFGE, pulse types

INTRODUCCIÓN

El modo más común de transmisión de *Salmonella* es a través de la ruta fecal-oral, cuando se ingieren alimentos contaminados (Smith *et al.*, 2018). Sin embargo, el mayor número de brotes de *Salmonella* de la última década está relacionado con las aves de corral como reservorio principal (EFSA, 2018, 2019). El humano también puede ser portador de *Salmonella* a nivel intestinal, aunque de menor importancia, de allí que el rol de los animales en las infecciones humanas es de relevancia (Cummings *et al.*, 2012). Se tuvo un brote en 2010 en EE. UU. con más de 2000 casos reportados en personas por efecto de la contaminación en la cadena de producción de alimentos, lo que llevó a un retiro masivo de más de medio billón de huevos (Cummings *et al.*, 2012).

Los serovares de *Salmonella* que causan enfermedades están influenciados por la distribución geográfica del serovar o patogenicidad de la cepa. Según los CDC, los principales serovares de *Salmonella* que son responsables de la mayoría de los brotes en los Estados Unidos incluyen principalmente serovares no tifoideos de *Salmonella* (SNT) como: Enteritidis, Typhimurium, Newport, Infantis, Thompson, Mississippi (Bhunia, 2018). En la Unión Europea serovares de SNT como Enteritidis (48.7%), Typhimurium (12.4%), Typhimurium monofásico (11.1%), Infantis (12.4%) son los serovares más importantes en salud pública, reportados a partir de 694 brotes transmitidos por los alimentos en 2020 (EFSA, 2021b).

En 2014 se reportó en Perú una prevalencia de 29.8% de serovares de SNT en la producción primaria avícola, donde se identificaron seis serovares: Infantis (91.4%), Senftenberg (2.9%), Enteritidis (2.1%), Derby (1.4%) y Agona (0.7%), siendo en las granjas de pollo de engorde (48.7%) seguida de las granjas de ponedoras comerciales (13.2%) donde se observó la mayor prevalencia (Valderrama *et al.*, 2014). A nivel de faenamiento de pollo de engorde se hallaron prevalencias del 25.6% en carcasas evisceradas en centros de beneficios clandestinos en Lima (Zambrano *et al.*, 2013). En 2022, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) encontró un incremento en los aislados de SNT en carne de pollo (12.3%; 20/163) de muestras frente al 1.4% (3/213) de muestras positivas de 2020, siendo Lima el departamento con mayor porcentaje de aislados (30%) (SENASA, 2022).

En el estudio de Parra-Payano *et al.* (2019) se revisaron los aislados de *Salmonella* invasiva a partir de 70 casos en niños menores de 4 años y ancianos con síntomas de fiebre, diarrea y decaimiento de un hospital de Lima, encontrando que el 85.7% de los casos se debió a *Salmonella* no tifoidea.

La subtipificación bacteriana es una herramienta que se usa para discriminar entre cepas bacterianas; lo que permite estudios filogenéticos, investigación de brotes y la vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Dentro de los métodos de subtipificación que se han utilizado para *Salmonella*, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) ha demostrado superioridad y poder de permanencia en comparación con otros métodos que se desarrollaron al mismo tiempo (PulseNet, 2017). PFGE permite determinar la relación de casos individuales, detectar, establecer brotes y determinar el vínculo entre la salmonelosis humana y el consumo de alimentos de origen animal (Khaita y Doetkott, 2012). Por ello, el obje-

tivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente mediante PFGE los aislados de serovares de *Salmonella* no tifoidea provenientes de muestras humanas y productos aviares para determinar la relación existente entre ellos mediante porcentajes de similitud, de manera de poder sugerir mejores estrategias de control y prevención de la diseminación de esta bacteria, aportando en el Programa de Vigilancia y Control de ETA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *Salmonella enterica*

Se analizaron 49 aislados de serovares de *Salmonella enterica* no tifoidea (SNT) de casos clínicos humanos y de origen aviar obtenidos en el periodo 2012-2017 provenientes del departamento de Lima. Los aislados de *Salmonella* de origen humano provenían de pacientes con cuadros diarreicos, y fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (INS). Se seleccionaron 18 aislados de serovares de SNT mediante números al azar a partir del registro del cepario (Cuadro 1). Los aislados de origen aviar (n=31) provinieron del cepario de casos del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM); los cuales fueron obtenidos a partir de muestras de cama de ave, vísceras, carcasas de pollo de engorde y huevos comerciales (Cuadro 2).

Identificación fenotípica de *Salmonella* sp.

Los aislados de *Salmonella* se obtuvieron entre los años 2012 y 2017 de acuerdo con los protocolos establecidos en los laboratorios del INS y de la FMV-UNMS, basados en la ISO 6579:2002 y el *Bacteriological Analytical Manual on line diciembre 2007 Capítulo 5: Salmonella (BAM FDA on line)*. La identificación se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas convencionales.

Cuadro 1. Lista de aislados criopreservados de serovares de *Salmonella enterica* no tifoidea (SNT) de pacientes humanos con diarrea obtenidos durante el periodo 2012-2017 en el departamento de Lima

Aislado	ID	Año del aislamiento	Fórmula antigénica Esquema Kauffmann White Le Minor	Serovar <i>Salmonella</i>
1	H1	2012	1,4,[5],12: i:1,2	Typhimurium
2	H2	2017	8,20:i:z6	Kentucky
3	H3	2012	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
4	H4	2012	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
5	H5	2015	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
6	H6	2012	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
7	H7	2012	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
8	H8	2012	6,7,14:r:1,5	Infantis
9	H9	2012	6,7,14:r:1,5	Infantis
10	H10	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
11	H11	2013	6,7,14:r:1,5	Infantis
12	H12	2013	6,7,14:r:1,5	Infantis
13	H13	2014	6,7,14:r:1,5	Infantis
14	H14	2014	6,7,14:r:1,5	Infantis
15	H15	2013	6,7,14:r:1,5	Infantis
16	H16	2014	6,7,14:r:1,5	Infantis
17	H17	2016	6,7,14:r:1,5	Infantis
18	H18	2016	6,7,14:r:1,5	Infantis

Fuente de los aislados: Instituto Nacional de Salud (INS)

Identificación molecular de *Salmonella* sp.

Todos los aislados de *Salmonella* fueron confirmados mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para ello, la extracción de ADN se realizó a partir de un cultivo puro de 14-16 h a 37 °C en Caldo Tripticasa de Soya (TSB). El procedimiento de extracción se realizó según el protocolo para bacterias gram negativas del kit comercial de extracción Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification (ThermoFisher Scientific). La mezcla de reacción fue ajustada a un volumen final de 50 µL según las condiciones descritas en el protocolo FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack (Roche): 12.8 µL agua PCR; 2.5 µL de buffer PCR 10x, 2 µL 25 mM MgCl₂,

0.5 µL del mix de nucleótidos grado PCR; 2.5 µL cebador 1, 2.5 µL del cebador 2; 0.2 µL de FastStart Taq DNA polimerasa (Roche) y 2 µL del ADN extraído previamente de cada aislado bacteriano. Las secuencias de los cebadores y las reacciones de PCR se realizaron bajo las condiciones descritas en 2007 por Bhatta *et al.* (2007) para el gen *invA*.

Serotipificación de los aislados de *Salmonella* sp.

Todos los aislados fueron serotipificados. Se utilizaron antisueros somáticos y flagelares; polivalentes y monovalentes (Denka Seiken). La metodología se basó de acuerdo con lo recomendado por la ISO 6579:2002 y Caffer

Cuadro 2. Lista de aislados criopreservados de serovares de *Salmonella enterica* no tifoidea (SNT) de origen aviar, obtenidos durante el periodo 2012-2017 en el departamento de Lima

Aisla- do	ID	Muestra de origen	Año del aislado	Fórmula antigénica Esquema Kauffmann White Le Minor	Serovar <i>Salmonella</i>
1	A1	Vísceras (ponedora)	2015	1,4,[5],12: i:1,2	Typhimurium
2	A2	Folículo ovárico (ponedora)	2012	1,4,[5],12: i:1,2	Typhimurium
3	A3	Huevos comerciales (cáscara)	2017	1,4,[5],12: i:1,2	Typhimurium
4	A4	Carcasa (broiler)	2012	1,4,[5],12: i:1,2	Typhimurium
5	A5	Hisopado cloacal (broiler)	2013	1,9,12:g,m:-	Typhimurium
6	A6	Hisopado cloacal (broiler)	2012	1,9,12:g,m:-	Typhimurium
7	A7	Cama de ave (broiler)	2012	8,20:i:z6	Kentucky
8	A8	Hisopado cloacal (broiler)	2012	8,20:i:z6	Kentucky
9	A9	Hisopado cloacal (broiler)	2017	8,20:i:z6	Kentucky
10	A10	Cama de ave (ponedora)	2012	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
11	A11	Huevos comerciales (contenido)	2017	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
12	A12	Huevos comerciales (contenido)	2017	1,9,12:g,m:-	Enteritidis
13	A13	Vísceras (broiler)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
14	A14	Carcasa (broiler)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
15	A15	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
16	A16	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
17	A17	Folículo ovárico (ponedora)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
18	A18	Carcasa (broiler)	2016	6,7,14:r:1,5	Infantis
19	A19	Carcasa (broiler)	2015	6,7,14:r:1,5	Infantis
20	A20	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
21	A21	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
22	A22	Vísceras (broiler)	2016	6,7,14:r:1,5	Infantis
23	A23	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
24	A24	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
25	A25	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
26	A26	Carcasa (broiler)	2013	6,7,14:r:1,5	Infantis
27	A27	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
28	A28	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
29	A29	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
30	A30	Carcasa (broiler)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis
31	A31	Huevo comercial (cáscara)	2017	6,7,14:r:1,5	Infantis

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

et al. (2008). Los serovares fueron determinados mediante la fórmula antigénica y el uso del esquema de Kauffmann White Le Minor, siguiendo lo indicado por Grimont y Weill (2007) (Cuadros 1 y 2).

Reactivación de los Aislados

La reactivación de los aislados de origen aviar y humano se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Sánchez y

Corrales (2005) en la FMV-UNMSM y el Laboratorio de Enteropatógenos del INS, respectivamente. El protocolo consistió en sembrar una asada (10 µL aprox.) del criopreservado (previamente atemperado) en un tubo con 3 ml de TSB e incubado a 37 °C por 18 h. Luego se sembró por agotamiento una asada en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Agar XLD) e incubado a 37 °C por 24 h. Se observaron las colonias características, se sembraron en un vial (2 ml) con Agar Trypticasa de Soya (TSA) en pico de flauta y se incubaron a 37 °C por 18 h. Las colonias fueron enviadas al Laboratorio de Entero-patógenos del INS para la evaluación molecular.

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Los estudios de subtipificación molecular para los 49 aislados de SNT de origen aviar y humano se realizaron mediante PFGE de acuerdo con el protocolo del Laboratorio de Enteropatógenos del INS, el cual está basado según *Standard Operating Procedure PulseNet PFGE of Salmonella serotypes* (PulseNet, 2013).

El buffer de suspensión celular bacteriana (100 mM Tris, 100 mM EDTA y pH 8.0) se ajustó a una turbidez de 1-1.3. Esta suspensión se mezcló en partes iguales con agarosa (*Low-melting-Agarose*) al 2%, dispensada en moldes y luego almacenado a 4 °C por 20-30 min. Posteriormente, los tapones de agarosa se incubaron por 12 -18 h en 1 ml de buffer de lisis (0.5 EDTA, 0.5 M Tris, 1% N-laurylsarcosina) con proteinasa K a una concentración final de 250 µg/ml. Se realizaron 6 lavados (2 veces con agua estéril ultrapura y 4 veces con 0.01 M Tris-EDTA buffer, a pH 8.0) para remover el exceso de reactivos y debris celular de los tapones lisados. Se utilizó como estándar molecular de control una cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 (ATCC® BAA-664™).

El ADN fue digerido con 30 U de *XbaI* por 3 h en baño maría (37 °C). La electroforesis se llevó a cabo con TBE Buffer 0.5X

a 6V/cm y 14 °C con el sistema CHEF DRII. El tiempo de corrida fue de 18 h y el tiempo de pulsos de 2.16-63.8 s. Un marcador Ladder lambda PFG (48.5-1018.5 kb) fue usado como marcador de peso molecular. Se añadió 10 µL de bromuro de etidio a 10 mg/mL y se mezcló por 30 min. El gel fue visualizado en un transiluminador de rayos UV y las fotografías fueron captadas mediante un sistema de imágenes digital con el Sistema de Documentación Chemidoc XRS-Biorad.

Análisis de la Información

Los resultados de la PFGE fueron analizados mediante el programa Bionumerics v. 7.0. Se generó un dendrograma que muestra la relación *XbaI* – perfiles PFGE (pulsotipos) para las salmonelas en estudio. El análisis de las bandas se hizo mediante el método de UPGM (*Unweighted Pair Method with Arithmetic Averages*) donde se realizó el análisis de diversidad genética de los aislamientos. Para agrupar los patrones de bandas (pulsotipos) se utilizó el valor de corte de 90% de similaridad para indicar que existe relación genética entre los aislados (Tenover *et al.*, 1995; Hadžiabdić *et al.*, 2015).

RESULTADOS

Perfiles de PFGE de *Salmonella* Typhimurium

Los análisis de restricción realizados con la enzima *XbaI* distribuyeron los siete aislados de *Salmonella* Typhimurium en cinco pulsotipos con un porcentaje mayor o igual a 90% de similaridad: Typ1, Typ2, Typ3, Typ4 y Typ5. Los pulsotipos Typ1, Typ2, Typ3 y Typ5 son todos de origen aviar y están representados por un único aislado cada uno. El pulsotipo Typ4 contiene salmonelas de origen humano y aviar. Los aislados A4 (carcasa de broiler) y H1 (heces humanas) son indistinguibles (similaridad del 100%). Asimismo, el aislado H1 está relacionado con el aislado A5 (Hisopado cloacal de broiler) con un 96% de similaridad.

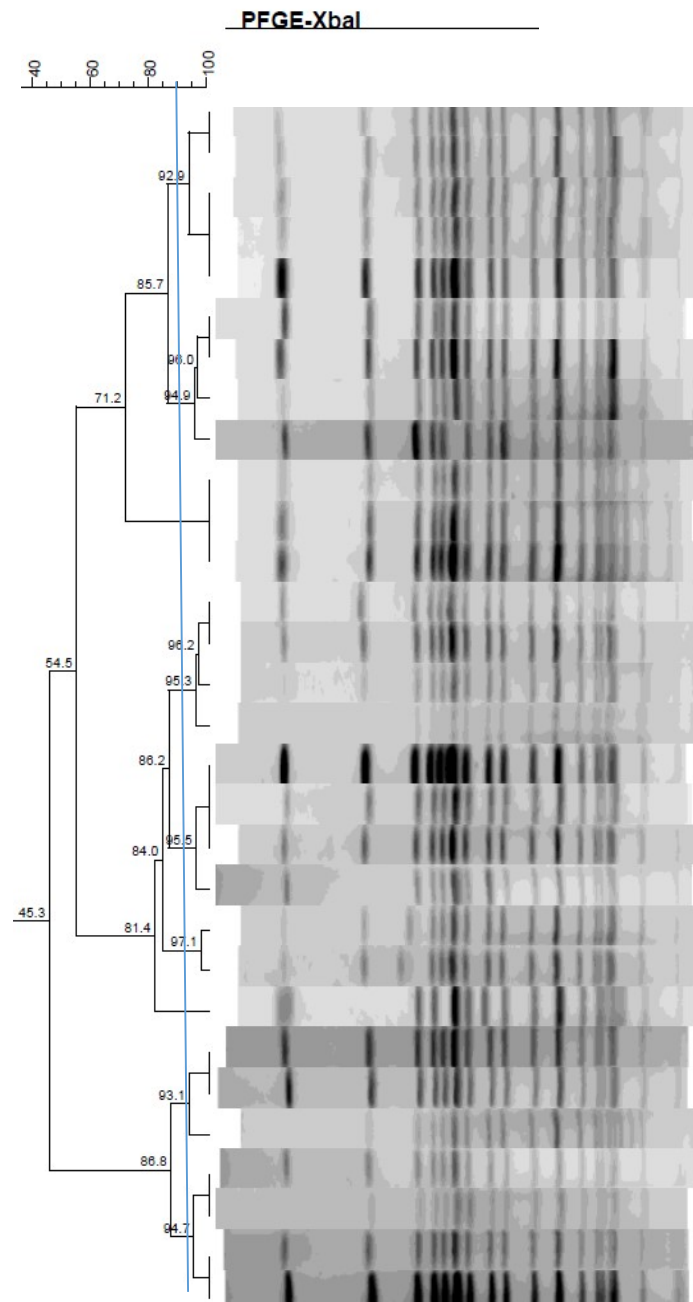


Figura 1. Análisis de PFGE de aislados de *Salmonella* Infantis obtenidos de casos clínicos humanos y productos avícolas

Perfiles de PFGE de *Salmonella* Kentucky

Los análisis de restricción realizados con la enzima *Xba*I distribuyeron los cuatro aislados de *Salmonella* Kentucky en tres

pulsotipos: Ken1, Ken2 y Ken3 con un porcentaje mayor o igual a 90% de similitud. Los pulsotipos Ken1 y Ken2 (de origen aviar) están representados por un único aislado cada uno. El pulsotipo Ken3 contiene salmonelas

de origen humano y aviar que se encuentran relacionadas con un porcentaje de 92.9 % de similitud.

Perfiles de PFGE de Salmonella Enteritidis

Los análisis de restricción realizados con la enzima *XbaI* distribuyeron los ocho aislados de *Salmonella* Enteritidis en cuatro pulsotipos con un porcentaje mayor o igual a 90% de similitud: Ent1, Ent2, Ent3 y Ent4. Los pulsotipos Ent1 (de origen aviar) y Ent3 (de origen humano) están representados por dos aislados cada uno. El pulsotipo Ent4 contiene solo salmonelas de origen humano y está representado por tres aislados, que son indistinguibles (similitud del 100%). Por último, el pulsotipo Ent2 está representado por un único aislado de origen aviar. Se observan porcentajes de similitud de hasta 96% entre los aislados aviarios, así como similitudes de hasta 100% entre los aislados humanos. No se observó relación entre los aislados aviarios y humanos que mostraron una similitud de 68.5%.

Perfiles de PFGE de Salmonella Infantis

Los análisis de restricción realizados con la enzima *XbaI* distribuyeron los 30 aislados de *Salmonella* Infantis en nueve pulsotipos con un porcentaje mayor o igual a 90% de similitud: Inf1-Inf9 (Figura 1). Se observó que los pulsotipos Inf2, Inf4, Inf5 e Inf8 agrupaban aislados de origen humano y aviar. El pulsotipo Inf2 están representados por cuatro aislados: H8 y H9 (origen humano), A18 y A19 (origen aviar). Los aislados H8 (heces humanas) y A18 (carcasa de broiler) fueron indistinguibles (similitud del 100%). El pulsotipo Inf4 está representados por cuatro aislados: H10 (origen humano), A23, A24 y A25 (origen aviar). Los aislados A23 (cáscara de huevos) y H10 (heces humanas) fueron indistinguibles (similitud del 100%). El pulsotipo Inf5 estuvo representado por cuatro aislados: H11 y H12 (origen humano), A26 y A27 (origen aviar). Los aislados H11 (heces humanas), A26 (carcasa de broiler) y

A27 (cáscara de huevos) fueron indistinguibles (similitud del 100%). El pulsotipo Inf8 estuvo representado por tres aislados: H13 y H14 (origen humano); y A31 de origen aviar.

DISCUSIÓN

La salmonelosis es la tercera causa de muerte en todo el mundo; por lo tanto, *Salmonella enterica* continúa siendo considerada como uno de los más importantes patógenos transmitidos por los alimentos. Los serovares de *Salmonella enterica* no tifoideos (SNT) son generalistas; es decir, tienen la capacidad de infectar tanto a los humanos como a los animales. La salmonelosis humana se relaciona principalmente con el consumo de productos animales contaminados (Ghoddusi *et al.*, 2019). Las aves de corral y sus subproductos (como carne y huevos) son conocidos reservorios de estas bacterias (Moulana y Asgharpour, 2022). Los síntomas causados por SNT son principalmente diarrea en humanos, pero en algunos casos pueden llegar a causar infecciones invasivas similares a las formas tifoideas (Ferrari *et al.*, 2019). Los reportes anuales de salmonelosis humana confirmadas indican que los cinco serovares más prevalentes en orden decreciente son Enteritidis, Newport, Typhimurium, Javiana y Typhimurium monofásico 4,[5],12:i:» en los Estados Unidos (CDC, 2016) y Enteritidis, Typhimurium, Typhi-murium monofásico 1,4,[5],12:i:», Infantis y Newport en la Unión Europea (EFSA, 2018).

En el presente estudio se evaluaron siete (n=7) aislados de *Salmonella* Typhimurium. Este serovar presenta una alta frecuencia en aves de corral y se convierte en una fuente de transmisión importante para el humano. De acuerdo a los informes de los CDC (2016) y EFSA (2018) es el segundo serovar de importancia en Europa y ocupa el tercer lugar en los Estados Unidos. En el presente estudio se observaron aislados de origen humano y pollo broiler (carcasa e hisopados de cloa-

ca) relacionados con una similaridad entre el 96 y 100%. Resultados similares fueron obtenidos por Henry *et al.* (2015), donde los aislados aviares (broilers) y aislados humanos de muestras clínicas de *S. Typhimurium* estuvieron altamente relacionados con porcentajes de similaridad (90.4 y 100%). Este serovar se ha generalizado en una amplia variedad de alimentos y por ello está involucrado en casos de brotes, donde los productos aviares (carne y huevos) están implicados en el 10.4% del total de casos en todo el mundo (Knight-Jones *et al.* (2010) y Ferrari *et al.* (2019).

Salmonella Kentucky no es uno de los principales serovares implicados en la salmonelosis humana y animal, pero se reportan casos clínicos humanos. Así, se informó su compromiso en el 0.2% de los casos de salmonelosis en los Estados Unidos entre 2003 y 2013, mientras que en Europa fue el séptimo serovar aislado con mayor frecuencia en 2011 (Haley *et al.*, 2019). Además, fue el serovar identificado con mayor frecuencia en pollos broiler entre 1998 y 2013 por el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, FSIS) (FSIS, 2013), lo que representa entre el 25 y 51% de todos los aislados (Haley *et al.*, 2019). En el presente estudio, se encontró en el pulsotipo Ken3 de *S. Kentucky* que los aislados H2 (heces humanas) y A9 (hisopado cloacal de carcasa de broiler) están relacionados con un 92.9 % de similaridad. Sobre estos hallazgos, si bien es cierto la relación de este serovar con brotes de salmonelosis en humanos es poco común, la posibilidad existe debido a los altos niveles de aislamiento en aves y subproductos (Ferrari *et al.*, 2019).

Los aislados aviares de *S. Enteritidis* obtenidos en el presente estudio a partir de huevos (yema) y de la producción primaria (cama de ave) presentaron porcentaje de similaridad de hasta 96%. De la misma manera los aislados humanos presentaron similitudes de hasta 100% entre ellos. Estos resultados muestran que este serovar es al-

tamente clonal, tal como fue observado por Rahmani *et al.* (2013), donde encontraron patrones indistinguibles entre los aislados de *S. Enteritidis* de origen aviar. Asimismo, Quino *et al.* (2020) encontraron una relación filogenética de dos clados bien definidos entre los aislados de *S. Enteritidis* de origen humano en Perú entre los años 2000-2018.

Los casos humanos de *S. Enteritidis* están más comúnmente relacionados con el consumo de huevos y aves de corral contaminados (Howard *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2017). Por ejemplo, Mü'tak *et al.* (2021) encontraron perfiles de *S. Enteritidis* de origen humano y origen aviar con una similaridad mayor al 99%. Sin embargo, a pesar de la alta homogeneidad genética observada en los aislados de cada origen por separado (aviar o humano), no se encontró en el presente estudio una relación importante entre los pulsotipos de *Salmonella* Enteritidis de origen humano con los de origen aviar (yema de huevo y cama de ave). Tal como lo indica EFSA (2021a), existen otras fuentes importantes de salmonelosis como los productos de panadería, carne de cerdo y sus productos y alimentos mixtos. También se le ha identificado en 40% de los brotes de ETA asociado a productos lácteos (EFSA, 2019). La frecuencia de ETA relacionadas con verduras y frutas también está en aumento (Wan *et al.* 2020).

Salmonella Infantis es el cuarto serovar más importante asociado a enfermedades humanas (Montoro *et al.*, 2023) y muchos de estos aislados se asocian a perfiles de multidrogoresistencia (Quino *et al.*, 2019). Existe evidencia que el serovar Infantis está fuertemente ligado al pollo broiler y sus derivados (Montoro *et al.*, 2023). Los pulsotipos de *Salmonella* Infantis encontrados en el presente estudio estuvieron altamente relacionados. Así, los pulsotipos de origen humano tuvieron similitudes mayores al 93% y los de origen aviar superiores al 92%, tal como lo menciona Rahmani *et al.* (2013). En otros estudios, Vinuesa-Burgos (2016), Nógrády *et al.* (2012), Taheri *et al.* (2018) y Pate (2019)

encontraron altas similitudes entre los aislados de *S. Infantis* provenientes de carne y heces de pollos broiler y huevos de ponedoras. Esto se debe posiblemente a que *Salmonella* *Infantis* tiene un ancestro reciente, con un número limitado de cambios evolutivos importantes acumulados en ese momento (Hauser *et al.*, 2012; Rahmani *et al.*, 2013).

Se observó que los pulsotipos de origen humano están altamente relacionados con los pulsotipos encontrados en carcasa de broilers (similitud de 95.5 al 100%), similitud que han sido reportadas en otros estudios. Así, Raseta *et al.* (2015) encontraron pulsotipos con una similitud del 100% entre aislados de *S. Infantis* de la piel de carcasa de broilers y humanos infectados. Esta alta homogeneidad sugiere el resultado de la expansión de un mismo clon de *S. Infantis* entre ambas matrices (Pate *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

- Se muestra una alta relación genética entre algunos aislados de origen aviar y aislados clínicos humanos de los serovares Typhimurium, Kentucky e *Infantis*, lo cual demuestra la transmisión de *Salmonella* de productos aviares a humanos en la región. En ese sentido, las entidades responsables como MINSA y SENASA deben implementar acciones de vigilancia y monitoreo más rigurosas en toda la cadena de producción; y programas para guiar y sensibilizar a los consumidores, los manipuladores de alimentos y los avicultores.
- Los aislados de origen aviar y humano del serovar Enteritidis poseen pulsotipos que no se relacionan o corresponden a un grupo clonal diferente.

LITERATURA CITADA

1. **Bhatta DR, Bangtrakulnonth A, Tishyadhigama P, Saroj SD, Bandekar JR, Hendriksen Kapadnis BP. 2007.** Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. *Lett Appl Microbiol* 44: 588-594. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02133.x
2. **Bhunias A. 2018.** *Salmonella enterica*. En: Bhunias A (ed). Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis. 2° ed. USA: Springer. p 271-287.
3. **Caffer MI, Terragno R, Binsztein N. 2008.** Manual de procedimientos: diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 37 p.
4. **[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2016.** National enteric disease surveillance: *Salmonella* Annual Report. CDC. 87 p.
5. **Cummings P, Sorvillo F, Kuo T. 2012.** The burden of salmonellosis in the United States. En: Mahmoud BSM (ed). *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen*. Croacia: InTech. p 1-20.
6. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2018.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12).
7. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2019.** The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17(12).
8. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2021a.** The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19(2).
9. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2021b.** The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19(12).
10. **Ferrari RG, Rosario DK, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EE, Conte-Junior CA. 2019.** Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Appl Environ Microb* 85: e00591-19. doi: 10.1128/AEM.00591-19

11. **[FSIS] Food Safety and Inspection Service. 2013.** Serotypes profile of *Salmonella* isolates from meat and poultry products January 1998 through December 2013. USDA. 126 p. [Internet]. Available in: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=a97f8ddc6a969-609e0275a90728595a484cb0451>
12. **Ghoddusi A, Nayeri B, Zahraei T, Akbarein H. 2019.** Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates in human, chicken, and cattle in Iran. Arch Razi Inst 74: 259-266. doi: 10.22092/ari.2018.120267.1190
13. **Grimont PA, Weill FX. 2007.** Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. 166 p.
14. **Hadžiabdić S, Rešidbegović E, Kušar D, Mićunović J, Očepk M. 2015.** Distribution of *Salmonella* Enteritidis genotypes among selected broiler flocks in Bosnia and Herzegovina. Slov Vet Res 52: 193-200.
15. **Haley BJ, Kim SW, Haendiges J, Keller E, Torpey D, Kim A, Crocker K, et al. 2019.** *Salmonella enterica* serovar Kentucky recovered from human clinical cases in Maryland, USA (2011–2015). Zoonoses Public Hlth 66: 382-392. doi: 10.1111/zph.12571
16. **Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Prager R, Schroeter A, Rabsch W, et al. 2012.** Clonal dissemination of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Germany. Foodborne Pathog Dis 9: 352-360. doi: 10.1089/fpd.2011.1038
17. **Henry I, Chemaly M, Granier S, Lalande F, Courtillon C, Salvat G, Cardinale E. 2015.** Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and serovar 1,4,[5],12:i:- isolates determined by pulsed field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility: comparison of isolates from broiler chickens, humans and the environment in Reunion Island. Open Vet Sci J 9: 10-18. doi: 10.2174/1874318801509010010
18. **Howard ZR, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC. 2012.** *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. Food Res Int 45: 755-764.
19. **Khaita M, Doetkott D. 2012.** Antimicrobial drug resistance and molecular characterization of *Salmonella* isolated from domestic animals, humans and meat products. En: Mahmoud BSM (ed). *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen*. Croacia: InTech p 215-258.
20. **Knight-Jones TJD, Mylrea GE, Kahn S. 2010.** Animal production food safety: priority pathogens for standard setting by the World Organisation for Animal Health. Rev Sci Tech OIE 29: 523-535. doi: 10.20506/rst.29.3.1994
21. **Long M, Yu H, Chen L, Wu G, Zhao S, Deng W, Chen S, et al. 2017.** Recovery of *Salmonella* isolated from eggs and the commercial layer farms. Gut Pathog 9: 74. doi: 10.1186/s13099-017-0223-8
22. **Montoro L, Lorenzo L, Marco A, Vega S, Marin C. 2023.** Holistic strategies to control *Salmonella* infantis: an emerging challenge in the European broiler Sector. Microorganisms 11: 1765. doi: 10.3390/microorganisms11071765
23. **Moulana Z, Asgharpour F. 2022.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from poultry: a review. J Poult Sci 10: 13-26. doi: 10.22069/psj.2022.-19783.1759
24. **Müptak I, Müptak H, Sariçam Ynce S. 2021.** Genotypic correlation between *Salmonella* Enteritidis isolates from broiler breeders and hatchery flocks. Acta Vet-Beograd 71: 392-402. doi: 10.2478/acve-2021-0033
25. **Nógrády N, Király M, Davies R, Nagy B. 2012.** Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. Int J Food Microbiol 157: 108-112. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.-04.007

26. **Parra-Payano V, Rondón-Paz C, García C. 2019.** Salmonellosis invasiva en un hospital de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 36: 464-468. doi: 10.17843/rpmesp.2019.363.4330
27. **Pate M, Mičunović J, Golob M, Vestby LK, Očepek M. 2019.** *Salmonella* Infantis in broiler flocks in Slovenia: the prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability. *Biomed Res Int* 2019: 4981463. doi: 10.1155/2019/4981463
28. **PulseNet. 2013.** Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-o157 (STEC), salmonella serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. [Internet]. Available in: https://pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-Shig-PFGEprotocol.pdf
29. **PulseNet. 2017.** Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. [Internet]. Available in: https://pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf
30. **Quino W, Hurtado CV, Escalante-Maldonado O, Flores-León, D, Mestanza O, Vences-Rosales F, Zamudio ML, et al. 2019.** Multidrogresistencia de *Salmonella* Infantis en Perú: un estudio mediante secuenciación de nueva generación. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 36: 37-45. doi: 10.17843/rpmesp.2019.361.3934
31. **Quino W, Caro-Castro J, Mestanza O, Hurtado CV, Zamudio ML, Gavilán RG. 2020.** Phylogenetic structure of *Salmonella* Enteritidis provides context for a foodborne outbreak in Peru. *Sci Rep* 10: 22080. doi: 10.1038/s41598-020-78808-y
32. **Rahmani M, Peighambari SM, Svendsen CA, Cavaco LM, Agersø Y, Hendriksen RS. 2013.** Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet Res* 9: 66. doi: 10.1186/1746-6148-9-66
33. **Raseta M, Djordjevic V, Vidanovic D. 2015.** Contamination routes of *S. Infantis* in food chain of broiler meat production and its significance for public health. *Procedia Food Sci* 5: 254-257. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.073
34. **Sánchez LC, Corrales LC. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova* 3: 21-29.
35. **SENASA. 2022.** Informe del monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos, año 2021: SENASA Perú. Informe técnico. p 66. [Internet]. Available in: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3048004/INFORME_-21_VF.pdf.pdf?v=1651174473
36. **Smith S, Ajayi A, Seriki A. 2018.** *Salmonella*. En: Liu D (ed). Handbook of foodborne diseases. USA: CRC Press. p 409-416.
37. **Taheri H, Peighambari S, Shahcheraghi F, Solgi H. 2018.** Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* serovar infantis isolates from Poultry. *Iran J Vet Med* 12: 187-198. doi: 10.22059/ijvm.2018.236580-1004821
38. **Tenover F, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239. doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995
39. **Valderrama M, Quevedo M, Pastor J, Mantilla Y, Ortiz M. 2014.** Estudio de prevalencia de serovares de *Salmonella* en las granjas avícolas tecnificadas en el Perú. Lima: SENASA. 31 p.

40. **Vinueza-Burgos C, Cevallos M, Ron-Garrido L, Bertrand S, De Zutter L. 2016.** Prevalence and diversity of *Salmonella* serotypes in Ecuadorian broilers at slaughter age. Plos One 11: e0159567. doi: 10.1371/journal.pone.-0159567
41. **Wan J, Guo J, Lu Z, Bie X, Zhao H. 2020.** Development of a test kit for visual loop-mediated isothermal amplification of *Salmonella* in spiked ready-to-eat fruits and vegetables. J Microbiol Meth 169: 105830. doi: 10.1016/j.mimet.2019.105830
42. **Zambrano H, Lucas J, Vilca M, Ramos D. 2013.** Determinación de *Salmonella* spp en centros de beneficio clandestino de pollos de engorde en Lima, Perú. Rev Inv Vet Perú 24: 337-345.