

PARADA, JULIAN
Epidemiologia molecu

2012

71116

71116

MFN:
Clasif:
T-720

71116



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Agronomía y Veterinaria

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TRANSMISIÓN
DE *SALMONELLA ENTERICA* DE LA CACHORRA
A SU PROGENIE**

MV Julián Parada

Trabajo de tesis para optar al grado académico de
Magister Scientie en Salud y Producción Porcina

Director: **MV MSc Bibiana R. Pelliza**

Co-director: **MV MSc Alicia I. Carranza**



12 / 12 / 2012

dedicado a mi padre...

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quiero agradecer a la República Argentina y su política de educación pública libre y gratuita que me permitió alcanzar un título de grado, ya la Universidad Nacional de Río Cuarto y sus docentes que fueron el instrumento para que esto fuera posible.

En el plano personal, debo agradecer a mi papá por enseñarme a tener pasión por lo que uno hace; a mi mamá por la formación ética y moral, y por ser una cariñosa y comprensiva guía a lo largo de toda mi vida; a mis hermanos por ser una fuente de inspiración y apoyo; a mis tíos y primos por su atención durante mis estancias en la capital; y a mis amigos por tantos buenos momentos vividos y tantos otros que fueron más fáciles con ellos a mi lado.

En lo académico, quiero agradecer al Grupo de Salud Porcina por permitirme realizar este trabajo y en especial a Naly por la formación profesional adquirida a su lado; a mis directores Bibiana y Alicia por acompañarme y aguantarme durante todo este trabajo de tesis; a Mariana y todo el equipo de trabajo del Servicio de Enterobacterias del INEI "Carlos G. Malbrán" por su predisposición; y a todos mis compañeros del Departamento de Patología Animal, docentes y no docentes, por ser una fuente de consulta y colaboración en las tareas diarias, y en especial a Analía por su ayuda en el laboratorio; y no quiero olvidarme de los ayudantes de cátedra y de investigación por su contribución y compañía diaria.

GRACIAS...

Julián

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

Importancia de la salmonelosis	1
Salmonella	2
Salud Pública	5
Salmonelosis y animales de consumo	6
Situación Internacional	7
Situación Nacional	8
Prevalencia de Infección	9
Epidemiología Molecular	15
Salmonelosis en el cerdo	16
Dinámica de la Infección	20
Factores de Riesgo	22

HIPOTESIS	27
-----------	----

OBJETIVOS

Objetivo General	27
Objetivos Específicos	29

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la Prevalencia de Infección en las Cachorras	31
1. Muestras	
1.1. Muestreo en Granja	31
1.2. Muestreo en Frigorífico	32
2. Procesamiento de la muestras	
2.1. Serología	32
2.2. Bacteriología	34
2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
2.4. Serotipificación	40
2.5. Subtipificación genética de cepas (PFGE)	41
3. Determinación de la Prevalencia de Infección en la Progenie	43
3.1. Serología	43
3.2. Bacteriología, PCR y Serotipificación	43
3.3. Subtipificación genética de cepas	44
4. Comparación Genética	44

RESULTADOS

Prevalencia de Infección en las Cachorras	45
Prevalencia de Infección en la Progenie	50
Comparación Genética	53

DISCUSIÓN	
Prevalencia de Cachorras con Anticuerpos contra <i>Salmonella</i> spp	55
Prevalencia de Cachorras Eliminadoras de <i>Salmonella enterica</i>	56
Prevalencia de Cachorras Positivas a <i>Salmonella enterica</i> en Frigorífico	59
Prevalencia de Infección en las Cachorras	64
Prevalencia de Infección en la Progenie	67
Comparación Genética	71
Transmisión de <i>Salmonella</i> de la Cachorra a su Progenie	72
CONCLUSIÓN	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO 1	
Reporte de la UE	101
ANEXO 2	
Flujograma para la serotipificación de <i>Salmonella enterica</i>	102

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Importancia de la salmonelosis

Las infecciones por *Salmonella* en cerdos son de importancia por dos razones principales. Por un lado, la enfermedad clínica (salmonelosis) que puede producirse en los cerdos, y por otro lado, la infección con serovariedades que pueden ser una fuente de infección en los productos de carne de cerdo (Schwartz, 2000).

La importancia en producción animal se ve reflejada en reportes de Muirhead & Alexander (2001), quienes plantean que la mortalidad producida en cuadros de salmonelosis, sumado a las pérdidas de producción y la afección de los índices de conversión, generan un costo estimado de £16.200/año/cada 100 madres en producción.

Por otro lado, desde el punto de vista de la Salud Pública, las infecciones causadas por *Salmonella* spp. constituyen una de las enfermedades zoonóticas más importantes en el mundo (Anonymous, 2006a). Afectan a todos los grupos etáreos, presentando cuadros más severos en niños menores de 5 años, ancianos e inmunocomprometidos (Ramos Moreno y col., 2008; Schulze y col., 2009; Lakshmaiah y col., 2009). La principal reserva de *Salmonella* está en los animales, y estos microorganismos son transmitidos al hombre en forma directa o, más comúnmente, a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal (Plym Forshell & Wierup, 2006).

Partiendo de los 36.184 aislamientos de *Salmonella* de casos clínicos en humanos reportados por el Centro para el control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos en el 2005 (CDC, 2006), se estima que los costos socio-económico atribuidos a salmonelosis transmitida por alimentos en ese país estarían entre los 2,3 y los 12,8 billones de dólares anuales, y específicamente, más de 81,53 millones de dólares para

casos asociados con consumo de carne de cerdo (Frenzen y col., 1999; Miller y col., 2005). Sumado a esto, según un estudio europeo, se estima que la implementación de los diferentes métodos de control para reducir el nivel de patógenos en la canal dentro del frigorífico (agua caliente, ultrasonido, ácido láctico 2,5% por 5seg) requiere de €5,4 millones por año, lo que sugiere un costo promedio adicional por carcasa de entre €0,19 y €0,26 (Lawson y col., 2009).

Salmonella

Pertenecen al género *Salmonella* los bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), anaerobios facultativos y no esporulados.

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Este género fue objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Sin embargo, se mantienen las ideas desarrolladas por P.R. Edwards y H.W. Ewing en la década del 40, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Caffer y col., 2008).

Estudios del ADN mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, *Salmonella enterica* subespecie *salamae*, *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* y *Salmonella enterica* subespecie *indica* (Caffer y col., 2008).

A su vez, las subespecies de *Salmonella enterica* se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H.

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (subespecie I) y llevan un nombre relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez (Caffer y col., 2008).

Como las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres no siguen las reglas del “*International Code of Nomenclature of Bacteria*”, de manera que sus nombres se escriben en letras romanas (no itálicas) y con mayúscula; por ejemplo el nombre completo de *Salmonella* Typhimurium es *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Typhimurium. Como este nombre es muy largo, a los fines prácticos se utiliza directamente *Salmonella* Typhimurium.

Las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes y a *Salmonella bongori*, de baja incidencia en patología humana o animal, se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la fórmula antigénica, por ejemplo: *Salmonella* subesp. IV 50:b : - (*Salmonella enterica* subesp. *houtenae* 50:b : -) (Caffer y col., 2008).

Los nombres de todas las serovariedades están contenidos en el Esquema de White-Kauffmann-Le Minor, publicado periódicamente por el “Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París, Francia.

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando

un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Además de los animales que actúan como reservorio y fuente de infección de bacterias del género, se ha demostrado la presencia y viabilidad de *Salmonella* en el ambiente, con persistencia por largos periodos de tiempo (Jensen y col., 2006), especialmente con la formación de biofilms naturales que incluyen algas verdes, protozoos, hongos y bacterias, y que pueden estar presentes en diferentes cursos de agua (Sha y col., 2011).

Las serovariedades presentes dentro de *Salmonella enterica* se pueden clasificar en tres grupos:

a) Los que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de los cuadros de salmonelosis.

b) Los que infectan sólo al hombre: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Paratyphi C*.

c) Los que están adaptados a un huésped animal: *S. Abortusovis*, a los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos; *S. Gallinarum*, a las aves; *S. Choleraesuis*, a los cerdos.

Salmonella enterica posee una gran cantidad de factores de virulencia que intervienen en los mecanismos de patogenicidad (Boyen y col., 2008; García del Portillo y col., 2008; Spector & Kenyon, 2011). Sólo la invasión y supervivencia intracelular esta mediada por al menos 60 genes cromosómicos de virulencia codificados en diferentes islas de patogenicidad (Lahiri y col., 2010). Hasta el momento se han identificado 12 islas de patogenicidad presentes en el genoma de *Salmonella*.

Además de esto, *Salmonella enterica* posee diversos sistemas regulatorios dobles (TCS) que representan sensores capaces de identificar, desde la disponibilidad de nutrientes o pH, hasta diferentes moléculas de estrés oxidativo o tóxicas. Estos TCS

monitorean el ambiente y colaboran en la adaptación y supervivencia de la bacteria bajo ciertas condiciones (Lahiri y col., 2010). Investigaciones recientes han demostrado esta capacidad de adaptación de las variedades patógenas del género, no sólo a las posibles condiciones de estrés presentes (Spector & Kenyon, 2011), sino también a la regulación de los mecanismos genéticos requeridos en la patogénesis de *Salmonella enterica* según el huésped. En este sentido, Bearson & Bearson (2011) revisaron los últimos descubrimientos a partir de técnicas moleculares para la detección de factores de virulencia, resaltando las diferencias encontradas en la función y requerimientos para la patogénesis sistémica de *S. Typhimurium* en ratones, modelo típico de estudio, con los mecanismos que favorecen la colonización intestinal en cerdos. Estas diferencias marcan la adaptabilidad de los serotipos patógenos de *Salmonella*, mediante la expresión de factores de virulencia codificados en su estructura genética según el huésped.

Salud Pública

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y los animales de sangre caliente pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. Dentro de esta especie, las serovariedades que pueden transmitirse de los animales al hombre (salmonelosis no-tifoidea) constituyen la fuente más importante de infección en el humano.

La Unión Europea (UE), a través de sus reportes epidemiológicos, comunicó que en el año 2004 se presentaron 192.703 casos de salmonelosis no-tifoidea en la región (Anonymous, 2006a). Por su parte, Voetsch y col. (2004) estimaron que alrededor de 1,4 millones de personas por año manifiestan cuadros de salmonelosis no-tifoidea en Estados Unidos, lo que resulta en 15.000 hospitalizaciones y 400 muertes por año en ese país. Propusieron además, la existencia de 38,6 casos clínicos de salmonelosis no-tifoidea por cada caso confirmado por bacteriología. De modo similar, en Brasil se

estima que el 8% de los casos de diarrea en niños menores de dos años son producidos por infecciones por *Salmonella* no Typhi (Ramos Moreno y col., 2008).

En la República Argentina, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, recibe aislamientos de *Salmonella* recuperados de humanos derivados por los laboratorios participantes de la Red Nacional de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria y del Programa de Unidades Centinelas de Diarrea, así como también aislamientos de origen animal y de alimentos. Sin embargo, salmonelosis no-tifoidea no es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo que no se cuenta con datos estadísticos de presentación en Argentina.

Salmonelosis y animales de consumo

La importancia de la presencia de *Salmonella* en animales de producción para consumo, como aves (Aury col., 2010; Arnold y col., 2011) o bovinos (Dahshan y col., 2010), ha sido ampliamente descripta. En particular, el papel del cerdo en la epidemiología de la enfermedad puede estimarse con estudios realizados en Holanda y Dinamarca sobre los casos reportados de salmonelosis no-tifoidea en humano relacionados con el consumo de carne fresca de cerdo, donde encontraron que representan entre el 13,8% y 26,8% de los casos totales (Anonymous, 2005). Resultados similares se obtuvieron en Gran Bretaña (Davies y col., 2004) y para toda la Unión Europea (Anonymous, 2010).

Según estudios epidemiológicos sobre la presencia de *Salmonella enterica* en cortes de carne fresca y subproductos disponibles para el público, se reportó el 0,1% de prevalencia en el Reino Unido (Gormley y col., 2010) y el 2,6% en Irlanda (Prendergast

y col., 2009), donde también se encontró que el 24,5% de los subproductos del cuero de cerdo utilizados como juguetes para mascotas estaba contaminado con *Salmonella enterica* (Adley y col., 2011). Ambos estudios irlandeses reportan a *S. Typhimurium* como la serovariedad más frecuentemente aislada, con el 85% y 36% de los positivos respectivamente (Prendergast y col., 2009; Adley y col., 2011).

Vo y col. (2006) en un estudio que comparó las serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas de casos clínicos en humanos con aislamientos de alimentos y animales en Vietnam, encontraron que muchos de los serotipos y fagotipos hallados en humanos también eran frecuentemente aislados en cerdos, lo que identifica al cerdo como una de las fuentes de infección de salmonelosis no-tifoidea en el hombre, al menos en ese país asiático.

Situación internacional

La creciente aparición de casos de salmonelosis transmitidas por alimentos en todo el mundo, ha llevado a los países de manera individual o en asociación, como la UE, a desarrollar programas que mitiguen la infección en humanos a través del control en animales. Es así que surgen la Directiva Europea 2003/99 y la Regulación (EC) N°2160/2003 que obligó a los Estados Miembros a implementar programas de control contra *Salmonella*; y luego en 2006, la Regulación (EC) N°668/2006, donde la UE reglamentó la obligatoriedad de realizar en 2007 un estudio para determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en cerdos mediante un muestreo de ganglios mesentéricos ileocecales (GMI) de animales en frigorífico (Anonymous, 2006b). En el 2008 y como resultado de este estudio, se informó que en 24 de los 25 Estados Miembros se aisló *Salmonella* spp. con una prevalencia media de 10,3%, llegando en algunos Estados al 29,0% del total de los cerdos faenados. Las variedades *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S.*

Rissen, *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Bredeney* y *S. Infantis* fueron las más frecuentemente aisladas (Anonymous, 2008a). La tabla con los resultados más importantes del Informe de Situación de la UE puede verse en el **ANEXO 1**.

La magnitud global del problema queda manifiesta en estudios realizados en numerosos países que estiman la prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella* spp. utilizando técnicas serológicas. Específicamente, se puede señalar a Bélgica con el 91% de granjas positivas (Hautekiet y col., 2008), Reunion Island 40% (Cardinale y col., 2010), Estados Unidos 64% (Carlson y col., 2001) y Canadá 95% (Farzan y col., 2006). Además de esto, estudios realizados en Dinamarca (Benschop y col., 2008), Alemania (Merle y col., 2011) y el Reino Unido (Clough y col., 2009) comprobaron la existencia de patrones de distribución espacial del nivel de infección de granjas según regiones geográficas.

Situación nacional

En los últimos años, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” reportó a las serovariedades *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Infantis* como las más frecuentes en casos clínicos de salmonelosis en humanos; mientras que en animales predominaron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* y *S. Dublin*, con variaciones de acuerdo a la especie animal (Caffer y col., 2007). Con respecto al cerdo, existe escasa información sobre las serovariedades de *Salmonella enterica* que se presentan en los sistemas productivos de este país. En un trabajo realizado por Ibar y col. (2009), a partir de un muestreo de contenido de colon (CC) y GMI de cerdos faenados en cuatro frigoríficos de Argentina, se reportó a las serovariedades *S. Schwarzengrund* y *S. Heidelberg* como las más frecuentemente

aisladas.

Por su parte, Vigo *y col.* (2009) reportaron las serovariedades *S. Bovismorbificans* y *S. Muenster* como las aisladas de muestras de materia fecal (MF) en una granja porcina de múltiples sitios de Argentina. Informaron además, que el 90% de las muestras de MF tomadas en los corrales de cerdos de 35 días de vida fueron positivas a *Salmonella enterica*.

Prevalencia de Infección

La importancia creciente de los subproductos del cerdo como intermediario en la transmisión de *Salmonella* al hombre, sumado a la alta asociación estadística encontrada por diferentes autores entre la prevalencia en una granja y la contaminación de las canales porcinas en frigorífico durante la faena de esos animales (Kranker *y col.*, 2003; Côté *y col.*, 2004; McDowell *y col.*, 2007), originó el desarrollo internacional de diversos programas de control y erradicación de *Salmonella* en granjas porcinas. Los ejemplos mas notorios son los que se llevan a cabo en Dinamarca (Møgelmoose *y col.*, 2000; Alban *y col.*, 2002; Albany *col.*, 2012), Reino Unido (Clough *y col.*, 2009) y Alemania (Merle *y col.*, 2011). Estos programas de control se basan en la clasificación de granjas en diferentes grados de riesgo según la prevalencia de cerdos infectados. La metodología diagnóstica para establecer la prevalencia de cerdos infectados es variable según el programa, y la mayoría incluye una combinación de técnicas diagnósticas, ya que según algunos autores ninguno de estos métodos puede ser utilizado en forma individual para estimar la prevalencia, más aún si se trata de piaras subclínicas (Kranker *y col.*, 2003).

Así por ejemplo, la mayoría de los programas de control utilizan pruebas de *Enzyme Like Immune Sorbent Assay* (ELISA) para detectar anticuerpos contra *Salmonella* spp. y de este modo establecer la prevalencia de cerdos seropositivos en la población, valor que se utiliza para clasificar la granja según el riesgo que representa. Sin embargo, existen discrepancias entre los diferentes planes en cuanto a la clasificación de piaras por serología en negativos y positivos; y a su vez dentro de estas últimas en piaras de baja, moderada o alta prevalencia (van der Wolf y col., 2001; Alban y col., 2002; de Vos y col., 2007). Cabe destacar que esta categorización parece ser necesaria para desarrollar medidas de control adecuadas a cada prevalencia de infección. Las discrepancias que se presentan, están asociadas a las diferencias existentes entre los resultados obtenidos por serología y el aislamiento del agente, ya sea del animal de manera individual o como población de una granja (Nollet y col., 2005a; Nowak y col., 2007), sumado a la inestabilidad en la seroprevalencia de *Salmonella* spp. en cerdos de diferentes lotes dentro del mismo establecimiento (Rostagno y col., 2012), sobre todo en granjas de baja producción (McKean & O'Connor, 2009).

Otra herramienta utilizada para establecer la prevalencia de infección por *Salmonella* en la población, es la bacteriología a partir de muestras de MF de cerdos tomada en la granja, o de una serie de órganos como tonsilas y GMI, o CC tomadas de cerdos durante la faena (Funk, 2003; Nollet y col., 2005a; Nowak y col., 2007; Magistrali y col., 2008). Cabe señalar que, si bien según diferentes autores la eliminación del agente bacteriano por materia fecal puede ocurrir dentro de los 14 días pos infección (Côté y col., 2004), o durante 18 a 26 días (Kranker y col., 2003), *Salmonella* puede incorporarse a las células del huésped y el animal permanecer como portador durante 26 semanas (Ghosh, 1972; Williams y col., 1981; Morrow y col.,

1999).Esta posibilidad de supervivencia intracelular en animales asintomáticos posee gran relevancia en el mantenimiento de las infecciones entre cerdos (Wilcock & Schwartz, 1992),y para la detección de animales portadores en frigorífico. Además, la presencia de los sistemas de *quorum-sensing* en *Salmonella* spp. le permiten la reactivación de infecciones latentes ante condiciones de estrés comunes en granjas o durante el transporte y estadía pre faena, lo que incrementa la cantidad de *Salmonella* excretada en heces (Walters & Sparandio, 2006).

Un ejemplo del uso de esta metodología fueron las primeras medidas tomadas por la UE para evaluar cuál era el impacto de *Salmonella enterica* en los cerdos producidos en la región, a partir de un muestreo de GMI de los cerdos faenados en frigoríficos europeos, con el objetivo de establecer una línea basal que brinde datos de la magnitud del riesgo que representa la carne y los subproductos de cerdo para la población (Anonymous, 2006b). Ese plan brindó información elemental para el diagnóstico de situación, aún cuando es difícil saber si esto tiene relación directa con los sistemas productivos de esa región, ya que si bien el monitoreo bacteriológico en frigorífico permite analizar los tejidos de un gran número de animales, presenta como desventaja la discrepancias en la representatividad de la situación en la granja debido a la posible contaminación de los animales durante el transporte o estadía en el frigorífico, que según algunos autores, representa la mayor fuente de contaminación cruzada de *Salmonella* (Vyt y col., 2006; Erdman y col., 2003; Mannion y col., 2012), sobre todo, porque la diseminación por el cuerpo puede darse a partir de las dos horas post-infección (Hurd y col., 2001).

En este sentido, Loynachan&Harris (2005), en un estudio donde expusieron cerdos a diferentes niveles de *Salmonella* Typhimurium a través de la vía intranasal y

ambiental, determinaron que la bacteria pudo ser aislada en tejidos como sangre, tonsilas, ganglio mandibular, timo, pulmón, hígado, GMI, riñón, músculo, íleon, además de contenido cecal y contenido de colon, a las tres horas post-infección. Sin embargo, necesitaron una concentración de al menos uno a tres logaritmos para causar infecciones intestinales o de otros tejidos respectivamente, por lo que presumen que las posibilidades de infección durante el transporte y estadía pre faena son bajas si se mantiene una adecuada higiene.

Por otro lado, Magistrali *y col.* (2008) realizaron un estudio de la dinámica de la infección de *Salmonella* en una granja, desde el ingreso de los cerdos hasta su salida para faena, pasando por el transporte. Los autores encontraron diferencias en las serovariedades aisladas en granja, que fueron *S. Typhimurium* y *S. Derby*, con las variedades de mayor frecuencia de presentación en ganglios mesentéricos ileocecales, contenido cecal e hisopados de la canal en frigorífico, que fueron *S. Hadar*, *S. Bovismorbificans* y *S. Bredeney*. Estas últimas fueron también aisladas en el camión de transporte de los animales, demostrando además, una relación clonal entre los perfiles genéticos de los aislamientos. Erdman *y col.* (2003) también encontraron diferencia entre las serovariedades y genotipos de *Salmonella* aislados de materia fecal de cerdos dentro de la granja, con aquellos aislados de ganglios mesentéricos ileocecales de cerdos de las mismas granjas, luego de su faena. Resultados similares fueron reportados por Mannion *y col.* (2012) quienes concluyeron que el transporte, el periodo de espera y la rutina de faena constituyen una importante fuente para la infección de cerdos con *Salmonella* spp.

Algunos de los factores importantes a considerar para establecer el nivel de infección de una población por bacteriología de MF se desprenden del estudio realizado por Guenther *y col.* (2010), donde evaluó la interacción de *Salmonella* y otras

Enterobacterias durante infecciones experimentales subclínicas de *S. Typhimurium* (DT104). Los autores encontraron que la presencia de *E. coli* en la materia fecal disminuyó con la edad de los animales, de la misma manera que no se observó un efecto protector de las poblaciones de *E. coli* u otras Enterobacterias para la infección de *Salmonella*, sino más bien una correlación entre el aumento en el conteo de *Salmonella* y el de otras Enterobacterias, y de alto número de *Salmonella* en mucosas con recuentos aumentados de *E. coli* adherida. Esto sugiere que cada población de Enterobacterias soporta la aparición de otras poblaciones, o bien, que el ambiente intestinal influye en el crecimiento de todas las poblaciones de Enterobacterias por igual.

Queda claro entonces, la necesidad de utilizar medios de cultivo selectivos y diferenciales para aumentar la sensibilidad y disminuir los falsos negativos por enmascaramiento por otras bacterias cuando se analiza materia fecal. Es por ello que la bacteriología de materia fecal para la detección de cerdos eliminadores de *Salmonella* spp. en granja se define como una técnica que posee una altísima especificidad, pero, los diferentes protocolos que se pueden utilizar se caracterizan por una sensibilidad variable, y muchas veces, poco satisfactoria (Funk, 2003).

Las marchas bacteriológicas típicas para el aislamiento de Enterobacterias incluyen cultivos de muestra clínicas en medios diferenciales y selectivos como el agar McConkey, agar SS, agar Hektoen, agar Rambach o agar XLD entre otros. Posteriormente, se realiza la identificación metabólica de la bacteria aislada, a partir de pruebas bioquímicas como la fermentación de azúcares, la producción de sulfuro de hidrogeno, deaminación de la lisina, hidrólisis de la urea, entre otras (Caffer y col., 2008).

Los programas nacionales para el control de salmonella en alimentos han desarrollado protocolos de cultivo que incrementan la sensibilidad de la técnica mediante el uso de sucesivos pasajes en medios de enriquecimiento no selectivo y selectivos que incrementan el número de colonias específicas, y por lo tanto facilitan su detección (Taskila *y col.*, 2012). Dentro de estos protocolos podemos encontrar el NMKL71 recomendado por el Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NNMKL) (Eriksson & Aspan, 2007) y el ISO6579/2002 recomendado por la Unión Europea (Regulación –EC- N°668/2006). Este último ha sido ampliamente utilizado para la detección de *Salmonella* spp. en muestras clínicas y de alimentos (Funk *y col.*, 2000; Nollet *y col.*, 2005b; Prendergast *y col.*, 2009; Torres *y col.*, 2011; Mannion *y col.*, 2012).

Asimismo, Arnold & Cook (2009) proponen que el procesamiento en *pooles* de muestras de MF es más efectivo que el procesamiento individual para detectar la infección por *Salmonella* en una piara. Esto coincide por lo encontrado por varios autores (Bahnsen *y col.*, 2006b; Arnold *y col.*, 2011), aun cuando esto no permitiría conocer la prevalencia de cerdos infectados dentro de la piara.

Desde los primeros protocolos descritos por Mullis *y col.* en 1986, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permitió obtener resultados específicos con elevada sensibilidad, en comparación con las técnicas de cultivo tradicionales (Stone *y col.*, 1994; Malorny & Hoorfar, 2005; Myint *y col.*, 2006; Eriksson & Aspan, 2007).

En *Salmonellae* se pueden utilizar diversos protocolos para la detección de genes ampliamente conservados y específicos del género, como el gen *invE* (Stone *y col.*, 1994), *16S* (Prendergast *y col.*, 2009) *oompC* (Malorny *y col.*, 2003a). Sin embargo, los

protocolos basados en la detección del gen *invA* son los que presentan mayor especificidad de especie, y por lo tanto, los más utilizados para la detección y confirmación de *Salmonella* spp. (Malorny y col., 2003a; Penmetchsa y col., 2009; Rao y col., 2010; Sha y col., 2011; Adley y col., 2011). Paralelamente, cuando se trabaja con muestras de alimentos o de animales se recomienda la inclusión de un control interno de amplificación para disminuir los falsos negativos (Malorny y col., 2003a y b).

Si bien la identificación temprana de *Salmonella* por PCR constituye una herramienta muy útil como prueba tamiz o “*screening*”, el aislamiento de la bacteria sigue siendo necesario para poder realizar una clasificación detallada del patógeno que permita implementar medidas específicas en programas de control y/o erradicación.

Epidemiología Molecular

El desarrollo de técnicas moleculares de tipificación genotípica ha logrado ser una herramienta muy útil en las investigaciones epidemiológicas (Foley y col., 2009). Estas metodologías permiten evidenciar diferencias en el genoma de aislamientos de una misma especie o serovariedad, pudiendo inferirse la relación clonal entre las mismas (Versalovic y col., 1991; Swaminathan & Barret, 1992; Versalovic y col., 1994; Olive & Bean, 1999; Weigel y col., 2004). De esta manera, es posible confirmar la ocurrencia de brotes, determinar fuentes de infección y vías de transmisión de patógenos, como también establecer la distribución y posibles rutas de diseminación de distintos subtipos genéticos.

Varias técnicas diagnósticas han sido utilizadas en los últimos años en estudios de epidemiología molecular, como ser la *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) PCR (De Busser y col., 2011), *Repetitive extragenic palindromic* (REP) PCR

(Ben-Darif *y col.*, 2010), *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) PCR (Nath *y col.*, 2010), *Multilocusvariable-number of tandem-repeats analysis* (MLVA) (Bergamini *y col.*, 2011), *Multilocus sequence typing* (MLST) (Litrup *y col.*, 2010) y *DNA microarray* (Litrup *y col.*, 2010). No obstante, la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) es considerada la “prueba de oro” por su alto poder discriminatorio y reproducibilidad; y ha sido ampliamente utilizada para la subtipificación de *Salmonella* (Nollet *y col.*, 2005b; Sandt *y col.*, 2006; K rouanton *y col.*, 2007; Vigo *y col.*, 2009; Dahshan *y col.*, 2010; De Busser *y col.*, 2011; Mannion *y col.*, 2012), y es la metodología de elección en el marco de la Red PulseNet Internacional (Swaminathan *y col.*, 2001; Ribot *y col.*, 2006).

Una ventaja de la reproducibilidad de la PFGE y de su estandarización con protocolos internacionales, es la capacidad de realizar comparaciones entre perfiles obtenidos en diferentes países. En este sentido, en un estudio realizado por Aarestrup *y col.* (2007) sobre la clonalidad y variación molecular de aislamientos de *S. Schwarzengrund* en Dinamarca, Tailandia y Estados Unidos, la PFGE permitió detectar la existencia de tres perfiles genéticos que representaron el 23% de los 180 aislamientos de *S. Schwarzengrund* de humanos y animales presentes en estos tres países. Sumado a esto, los datos obtenidos por PFGE permitieron suponer la transmisión de *S. Schwarzengrund* de pollos a personas en Tailandia; y de pollos, cerdos y pavos a personas en Dinamarca (Aarestrup *y col.*, 2007).

Salmonelosis en el cerdo

La mayoría de las enfermedades infecciosas que pueden afectar a los cerdos generan impactos económicos en la granja, puesto que deprimen tanto la eficiencia de

conversión alimenticia como la ganancia diaria de peso vivo, además de producir un posible aumento en la mortalidad. En el caso de las enfermedades que cursan con diarrea y fiebre como signo clínico de un cuadro agudo, se conoce que puede generarse un desmejoramiento de entre 0,1 y 0,3 en el índice de conversión (IC) de la granja y aumentar entre 5 y 20 días el tiempo en el que los cerdos alcanzan los 90kg. En casos crónicos de enfermedades entéricas, la afección se calcula un desmejoramiento del 0,3 en el IC y entre 4 y 5 días más para llegar a los 90kg (Muirhead & Alexander, 2001).

Desde el primer reporte de aislamiento de *Salmonella Choleraesuis* realizado por Salmon & Smith en 1886, se han encontrado un gran número de serovariedades capaces de infectar y producir cuadros clínicos o subclínicos en los cerdos (Davies, 1998; van Duijkeren y col., 2002; Griffith y col., 2006).

El cuadro clínico de salmonelosis producido por serovariedades de *Salmonella entericase* presenta principalmente en cerdos durante el post-destete, aproximadamente a los 50 días de vida, aunque todas las edades son susceptibles a la infección (Gooch & Haddock 1969; Wilcock y col., 1976), lo que estaría relacionado a la presencia de anticuerpos (Ac) adquiridos por inmunidad pasiva en primera instancia, y luego por Ac generados por el propio animal. La enfermedad puede presentarse con diferentes cuadros en forma independiente, como el septicémico, nervioso, respiratorio, abortivo y digestivo.

En forma general, los cerdos infectados con *S. Choleraesuis* presentan signos clínicos entre las 36 y 48 horas post-infección; y eliminan durante el curso clínico de la enfermedad entre 10^3 y 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria por gramo de materia fecal (Smith & Jones, 1967; Gray y col., 1995). Asimismo, en casos de

infecciones por *S. Typhimurium* puede arrojarse más de 10^7 UFC/gr materia fecal (Gutzmann y col., 1976).

Se considera que la principal ruta de transmisión de serotipos virulentos de *Salmonella enterica* entre cerdos es el contacto fecal-oral. Sumado a esto, el contagio puede producirse por contacto directo a través de secreciones o desde el ambiente contaminado al cerdo (Griffith y col., 2006). Schwartz (2000) plantea además la posibilidad de transmisión vertical de la hembra a su descendencia. También se ha descrito lavía aerógena como posible mecanismo de transmisión, sobre todo en variedades muy virulentas como *S. Typhimurium* (Oliveira y col., 2007), aunque, no pudo ser comprobada para serotipos como *S. Panama* (Oliveira y col., 2010).

Una de las principales limitantes en la transmisión sería la alta dosis infectante necesaria para producir un cuadro clínico. Según diversos trabajos, se necesitan más de 10^3 UFC de *S. Typhimurium* para producir una infección con presentación clínica de salmonelosis en cerdos (Loynachan & Harris, 2004 y 2005).

La variedad *S. Choleraesuis*, ampliamente adaptada al cerdo, es la responsable de la mayoría de los casos de salmonelosis septicémica en esta especie (Brown y col., 2007), y es, al mismo tiempo, considerada de gran importancia en los cuadros septicémicos en humanos (Chiu y col., 2004).

La salmonelosis septicémica del cerdo se caracteriza por la aparición de signos clínicos como fiebre, depresión, anorexia, disnea, decoloración azul-purpura de la piel en extremidades, orejas y hocico; e inclusive muerte súbita en cuadros hiperagudos. La presencia de neumonía intersticial o en algunos casos neumonía fibrinosa, linfadenopatía y necrosis hepática multifocal, son los hallazgos patológicos más

frecuentes de los cuadros septicémicos. Como regla general, pueden encontrarse múltiples focos hemorrágicos, desde petequias a equimosis, en la mayoría de los órganos y tejidos. La naturaleza de las lesiones anatomopatológicas de los cuadros septicémicos por *S. Choleraesuis* hace que deba ser considerada como uno de los diagnósticos diferenciales en casos de Peste Porcina Clásica (Brown y col., 2007).

Por otro lado, los cuadros entéricos de salmonelosis pueden ser atribuidos a un gran número de serovariedades no específicas de cerdo, entre las que se encuentran en primer lugar *S. Typhimurium*, y luego *S. Derby* o *S. Heidelberg* como las más frecuentemente aisladas (Schwartz, 2000; Alsop, 2005). Además, han sido reportados cuadros entéricos en cerdos infectados experimentalmente con *S. Panama* (Oliveira y col., 2010). La enteritis se caracteriza clínicamente por la presencia inicial de diarrea líquida amarilla en el 10 al 15% de los cerdos (Alsop, 2005), y que en pocos días puede afectar a la mayoría de los animales (Griffith y col., 2006).

La diarrea tiene una duración entre tres y siete días, aunque, suele presentarse en forma recurrente por varias semanas (Griffith y col., 2006). Los cerdos afectados pueden manifestar fiebre, anorexia y deshidratación concomitante a la diarrea. Guenther y col. (2010), a partir de infecciones experimentales, asociaron la presencia de bajos números de *Salmonella* en el contenido de colon con el incremento de temperatura corporal del animal. Los autores reportaron que el 33,3% de los animales manifestó temperatura corporal superior a 40°C, y el 41,6% tuvo diarrea durante el período de observación pos infección de 4 semanas.

La mortalidad del cuadro entérico es generalmente baja, con valores de alrededor del 1,8% (Alsop, 2005), y está relacionada a la deshidratación y al desequilibrio electrolítico (hipokalemia) producido por la diarrea. La mayoría de los cerdos se

recupera completamente, aunque una proporción puede quedar como portador y arrojar *Salmonella* en materia fecal en forma intermitente, hasta por cinco meses (Griffith y col., 2006). Las lesiones anatomopatológicas asociadas a cuadros entéricos de salmonelosis se caracterizan por una tiflocolitis fibrino necrótica, con formación de membranas pseudodiftéricas (Brown y col., 2007).

Dinámica de la infección

La evaluación de la dinámica de la infección por *Salmonellaenterica* en una granja porcina es compleja y variable. No obstante, es ampliamente aceptado que la principal fuente de diseminación de la enfermedad es a partir de las heces de animales infectados que contaminan las instalaciones (Wood y col., 1989; Davies y col., 1999; Jensen y col., 2006).

Según Nowak y col. (2007) los animales infectados que se encuentran arrojando *Salmonella* en su materia fecal podrían ser identificados con el uso de la técnica serológica de ELISA con un punto de corte del 20% de Densidad Óptica (DO). Cabe destacar, que diferentes autores señalan que la seroconversión a partir de la infección por *Salmonella* posee una alta variación individual, existiendo animales que nunca llegan a seroconvertir, por lo tanto, la serología debería utilizarse como diagnóstico de piaras y no individual (Nielsen y col., 1995; Harris, 2003b). Esto puede observarse en los resultados reportados por Kranker y col. (2003) en un estudio longitudinal en cerdos con problemas de salmonelosis por *S. Typhimurium* en tres granjas porcinas de Dinamarca. En cada una de las granjas, siguieron los cerdos durante las diferentes etapas de producción, desde el nacimiento hasta la faena, tomando muestras de sangre y materia fecal, agregando además el muestreo de las madres al destete. Los autores

detectaron *Salmonellaspp.* al menos una vez en las heces del 53,1% de los animales analizados, aunque el 62,4% de los cerdos fueron seropositivos más de una vez. Reportaron además, que el 30,5% de los cerdos que arrojaron *Salmonellaspp.* algunavez, no mostró respuesta serológica a lo largo del estudio, y que el 40,9% de los seropositivos nunca eliminaron *Salmonella spp.*

Es ampliamente aceptado que el uso de la serología para la detección de anticuerpos contra *Salmonella spp.* permite evaluar la dinámica de infección de *Salmonella* en una granja(Funk y col.,2001; Funk, 2003; Nowak y col.,2007; Arnold & Cook, 2009), a partir de la identificación del momento, progreso y nivel de infección general de la población (Nielsen y col.,1995; Harris, 2003a;Nollet y col.,2005a; Baum y col.,2005). Si bien, debe tenerse en cuenta que según Nielsen y col.(1997), la seroprevalencia en madres es un pobre predictor de la prevalencia en cerdos en engorde.

Según Kranker y col. (2003) en su trabajo de dinámica de infección, ninguna de las cerdas ni de los lechones fueron positivos a bacteriología en el momento previo al destete, mientras que los niveles de cerdos positivos aumentaron rápidamente en la recría, hasta llegar al pico de eliminadores que se dio a las nueve semanas de vida, para luego disminuir gradualmente hasta el final del engorde. Pese a esto, la respuesta serológica detectada utilizando un ELISA al 20%DO, se dio 30 días después del pico de eliminación, llegando al valor máximo a las 17 semanas de vida en la mitad de la etapa de engorde, con una marcada diferencia en arrojamiento de *Salmonellaspp.* y seroconversión entre cerdos de diferentes cohortes. Los autores concluyeron en destacar que los diferentes cursos de la respuesta bacteriológica y serológica expresan que bajo condiciones naturales los cerdos se infectan en diferentes momentos, con variabilidad en la expresión y magnitud en la respuesta del huésped.

Por otro lado, y a los fines prácticos, la serología permitetambién evaluar la transferencia de inmunidad pasiva de las madres a sus lechones, que en el caso de *Salmonella*, protegería a estos últimos hasta las seis semanas de vida, dependiendo del nivel de infección en madres (Proux y col.,2000; Lurette y col.,2008). Esto coincide por lo encontrado por Kranker y col. (2003), quienes además plantean que existe una reducción del 50% del riesgo de contagio durante la recría en lechones hijos de madres seropositivas. Así mismo, Hur & Lee (2010) en un estudio donde evaluaron el uso de una vacuna viva atenuada de *S. Typhimurium*, concluyeron que la inmunización de cerdas preñadas puede proteger a los lechones lactantes contra la infección por *Salmonella*, gracias a que la inmunidad pasiva inhibiría la adhesión, colonización e invasión de la bacteria en el intestino de los lechones.

Factores de riesgo

A través del estudio de los factores de riesgo y el análisis de componentes principales han sido identificado varios aspectos importantes en la transmisión de *Salmonella* spp. entre cerdos dentro de una granja, como son la bioseguridad de la granja, la higiene de las instalaciones y del personal, la sanidad de los animales, la estación del año y la variedad de *Salmonella enterica* actuante (Weigel y col., 2007; Baptista y col.,2009; Lurette y col.,2009).

Los factores estresantes, como la temperatura de la sala y la pobre asignación de espacio por animal, entre otras, suelen estar relacionados a una seroprevalencia mayor en la piara (Hautekiet y col.,2008). Uno de los factores más importantes en la diseminación de *Salmonella enterica* dentro de la granja es la falta de higiene, como ha sido indicado en estudios donde se relacionó una pobre rutina de desinfección y la

presencia de un gran número de cucarachas con una mayor seroprevalencia de *Salmonella* spp. (Cardinale y col., 2010). En este sentido, el uso de pediluvios es una herramienta fundamental para el control de la diseminación de la enfermedad, sobre todo si se tiene en cuenta que entre el 11% y el 22% de las botas suele estar contaminada con *Salmonella* (Barbel y col.,2002).

El ingreso a la granja de alimentos balanceados de origen externo fue propuesto como una fuente de ingreso de *Salmonellaspp.* en producciones porcinas de Dinamarca (Benschop y col., 2008). Por su parte, Torres y col. (2011) determinaron que el 27,5% de las fábricas de alimento en España estaban contaminadas ambientalmente por *Salmonella enterica*, encontrando también alimento contaminado en el 8,9% de las fábricas. Estos datos coinciden con lo planteado por García-Feliz y col.(2009) sobre la relación directa que existe entre el consumo de alimentos en forma de pellet y la eliminación de *Salmonella enterica* en materia fecal de cerdos en España.

A pesar de que se han realizado numerosos trabajos al respecto, actualmente no está claro el papel de las madres, y sobre todo de las cachorras de origen externo, en la introducción,transmisióny diseminación de *Salmonellaenterica*dentro de una granja (Davies y col.,2000; Funk y col.,2001; Nollet y col.,2005b; Vigo y col. 2009; Penmetchsa y col.,2009).

En un estudio dirigido por Nollet y col. (2005b), donde realizaron un seguimiento de cerdas durante los diferentes estadios de un ciclo reproductivo en tres granjas en Bélgica, pudieron determinar y plantear los posibles puntos temporales con mayor posibilidad de arrojamamiento de *Salmonellaenterica* en heces. Según los autores, durante la gestación tardía, alrededor del parto y durante la lactancia, la prevalencia de eliminadoras de *Salmonella enterica* fue menor al 10% en todas las granjas. A pesar de

los cambios hormonales e inmunológicos que se supone están implicados en estas etapas, no encontraron cambios periparturientos en los patrones de eliminación. Sin embargo, sí se evidenció un incremento en el número de eliminadoras siete días posteriores al destete. Sumado a esto, si bien no se encontraron diferencias significativas en el número de seropositivas, o en la DO% de los sueros en las diferentes etapas ni según el número ordinal de partos de la cerda, sí reportaron que las cerdas de más de cinco partos fueron las que tuvieron un menor arrojamamiento de *Salmonella enterica* en heces, mientras que no hallaron diferencias entre las hembras de primer parto y aquellas de dos a cinco partos. Los autores destacaron el rol de las cerdas en el mantenimiento de la infección de *Salmonella* en una granja de ciclo completo, considerando al estrés y a las condiciones de alojamiento que favorecen a infecciones posdestete, lo que incrementa el número de eliminadoras y la circulación de *Salmonella enterica* en el plantel reproductivo.

Por su parte, Funk y col. (2001), en un estudio realizado en dos granjas de múltiple sitio en Estados Unidos encontraron que la proporción de muestras positivas a *Salmonella enterica* fue mayor en la última parte de la gestación que en la lactancia.

Teniendo en cuenta estrictamente a las cachorras de reposición de origen externo, Davies y col. (2000) estudiaron los patrones de eliminación de *Salmonella* por dos cohortes de cachorras de reposición antes y después de introducirlas a una granja en los Estados Unidos. Los autores reportaron que *S. Typhimurium* var. Copenhagen fue la serovariedad predominante en la granja de origen con el 3,3% y 3,7% de las cachorras positivas a *Salmonella enterica* para cada una de las cohortes respectivamente. No obstante, en las muestras tomadas a las cachorras en la granja de destino, 11 días posteriores a su arribo, se aisló *Salmonella enterica* del 47% y 46% de las cachorras

para cada una de las cohortes respectivamente, con el 53% de los aislamientos clasificados como *S. Typhimurium* var. Copenhagen en la cohorte uno, pero, esta variedad no fue encontrada en la cohorte dos, donde *S. Heidelberg* representó el 89% de los aislamientos. Además, detectaron en una de las cohortes un aumento en la proporción de cachorras que eliminaban *Salmonella enterica* en sus heces del 20% al 46%, entre los cuatro a los 11 días posteriores al arribo. Como conclusión, los autores proponen que el movimiento de animales entre granjas es un factor muy importante en la epidemiología de *Salmonella enterica*, ya sea por la activación de infecciones latentes o por la adquisición de nuevas infecciones.

Penmetchsa *y col.* (2009) en un estudio donde evaluaron si las cachorras de reemplazo de origen externo introducían nuevos genotipos de *Salmonella* en una granja y si adquirirían la infección de los cerdos residentes, no encontraron evidencias de nuevos patrones genéticos de *Salmonella* spp. que fueran introducidos por las cachorras en ese estudio. En este sentido, sugieren que el riesgo de introducir nuevas cepas de *Salmonella* spp. a partir del ingreso de cachorras de reposición es muy bajo, sobre todo si se trabaja con hembras recién destetadas y se realiza un tratamiento preventivo con antibióticos orales durante su incorporación.

En Argentina, Vigo *y col.* (2009) trabajaron en una granja de sitios múltiples, donde aislaron la misma serovariedad, con similar patrón genético, en las madres, los lechones y en los cerdos de diferentes sitios de engorde. Asimismo, encontraron que el 90% de las muestras tomadas a animales de 35 días de vida fueron positivas a *Salmonella enterica*.

Finalmente, Silva *y col.* (2006) en un trabajo donde evaluaron las fases en las que ocurre la infección, encontraron que el 32% de las cerdas arrojaban *Salmonella enterica*

en materia fecal, tratándose todas ellas de cachorras de reposición externa, por lo que propone que estas constituyen un riesgo importante en la introducción de *Salmonella enterica* en el sistema productivo.

Queda claro que existen diferentes posiciones sobre la identificación de las cachorras como un factor de riesgo importante en la dinámica de la infección de cerdos por las diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* dentro de la granja. En este sentido, es importante sumar información al respecto que permita conocer el riesgo, sobre todo para tener en cuenta a la hora del diseño e implementación de programas de control de *Salmonella enterica* en la producción porcina.

HIPOTESIS
Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Las cachorras son un factor de riesgo importante en la diseminación de salmonelosis por transmitir subtipos genéticos de *Salmonella enterica* a sus crías durante la lactancia.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión de subtipos genéticos de *Salmonella enterica* de las cachorras a su progenie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar la prevalencia de infección por *Salmonella* spp. en las cachorras en la granja y durante la faena en frigorífico.
- b) Establecer la relación entre la prevalencia de infección en las cachorras y la presencia de animales que eliminan el patógeno en materia fecal.
- c) Evaluar si las serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas en las cachorras en la granja son las mismas que aquellas aisladas en el frigorífico durante la faena de animales de descarte.
- d) Establecer los subtipos genéticos de las serovariedades de *Salmonella enterica* presentes en las cachorras.
- e) Determinar la prevalencia de infección por *Salmonella* spp. en la progenie de las cachorras a través de la serología y la bacteriología de materia fecal y tejidos.
- f) Estimar la dinámica de infección por *Salmonella* spp. en cerdos en producción dentro de la granja mediante el análisis serológico y bacteriológico.
- g) Establecer los subtipos genéticos de las serovariedades de *Salmonella enterica* presentes en la progenie.
- h) Comparar los subtipos genéticos de las cepas de *Salmonella enterica* presentes en las cachorras con las aisladas en la progenie.
- i) Determinar la importancia de la transmisión de subtipos genéticos de *Salmonella enterica* de la madre a su progenie.

MATERIALES
Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en una granja confinada de parto terminación, de sitios múltiples, con estrictas medidas de bioseguridad, construida nueva para 4500 madres, con un sitio exclusivo para los machos, que fue poblada paulatinamente en grupos de 760 lechonas por semana, incorporando un total de 10 GRUPOS durante el periodo de estudio. Las lechonas provenían de un mismo origen, y habían sido destetadas antes de los nueve días de vida y llevadas al nuevo establecimiento. Cada GRUPO semanal ingresaba a una sala individual acondicionada, donde permanecieron desde los nueve a los 150 días de vida, luego se seleccionaron las cachorras que constituirían las madres del plantel reproductor y las restantes fueron enviadas a faena.

1. Determinación de la prevalencia de infección en las cachorras

1.1. Muestreo en Granja

Se determinó el número necesario de cachorras a muestrear para estimar la prevalencia de cachorras infectadas y/o eliminadoras de *Salmonella* spp. por grupo, con el programa *WIN Episcopo 2.0* (www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: prevalencia esperada 8%, 95% de Confianza y un error del 5%, resultando un n=100 animales por GRUPO. Las 100 cachorras fueron seleccionadas al azar en cada uno de los GRUPOS, a los 150 días de edad promedio. De cada cachorra se tomaron muestras de sangre de la vena cava y de MF por estimulación del recto. La sangre fue colocada en tubos, donde se separó el suero que fue guardado a -20°C. La MF fue refrigerada entre 2°C y 7°C hasta su procesamiento. Se completaron en 10 semanas de muestreo un total de 1000 muestras de sangre de 10 grupos y 719 muestras de MF de 8 grupos de cachorras.

1.2. Muestreo en frigorífico

De 236 cachorras que fueron enviadas a frigorífico, con un tiempo de transporte de 7hs promedio, se extrajeron los GMI siguiendo las recomendaciones y metodología propuesta por la Unión Europea (Anonymous, 2006b).

Brevemente, durante la faena los cerdos son insensibilizados por medio de electricidad para luego ser sangrados y pelados. Posteriormente son colgados en rieles para su traslado por la línea de faena donde son eviscerados. Los órganos son colocados en bandejas de acero inoxidable, siendo de este lugar donde fueron extraídos los GMI. Se tomó la suma de los GMI o al menos cinco GMI de los cerdos seleccionados y se colocaron en bolsas de plástico individuales. Cada muestra pesaba en promedio 25gr. Las muestras fueron refrigeradas entre 2°C y 7°C durante el transporte, hasta su procesamiento en el laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

2. Procesamiento de muestras

2.1. Serología

Para la detección de anticuerpos contra antígeno LPS (serogrupos B, C1 y D) de *Salmonella* spp. en los sueros de las cachorras se utilizó el kit comercial Herd-Chek® Swine Salmonella de ELISA indirecto, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (IDEXX Laboratories, Inc., Maine, USA).

2.1.1. Dilución de las muestras

Cada suero fue diluido en el Diluyente para Muestras en una proporción 1:20 utilizando una placa de dilución.

2.1.2. Incubación en placa tapizada con antígeno LPS

Se dispensaron 100µl de las muestras diluidas en los pocillos tapizados con el antígeno y se agregaron dos controles positivos y dos controles negativos no diluidos por placa. La incubación se realizó a temperatura ambiente (18-25°C) por 30 minutos. En este paso se logra la fijación de los anticuerpos presentes en el suero que sean específicos contra el LPS fijado en la placa.

2.1.3. Lavados

Para eliminar todo material que no quedó fijado a la placa, se descartó el contenido de los pocillos y se realizaron entre cuatro y cinco lavados con la Solución de Lavado 1X.

2.1.4. Conjugado

Se dispuso en cada pocillo 100µl de conjugado anti-porcino peroxidasa de rábano (HRPO) y se incubó la placa a temperatura ambiente (18-25°C) por 30 minutos. El conjugado HRPO se fija a los anticuerpos porcinos presentes en los pocillos.

2.1.5. Lavados

Para eliminar todo el conjugado HRPO que no quedó fijado a la placa, se descartó el contenido de los pocillos y se realizaron entre cuatro y cinco lavados con la Solución de Lavado 1X.

2.1.6. Revelado

Se agregaron 100µl del sustrato TMB en cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente (18-25°C) por 15 minutos, luego de los cuales se agregaron 100µl de la Solución de Frenado. El sustrato TMB reacciona con el conjugado HRPO presente en el pocillo generando una coloración cuya tonalidad es dependiente de la concentración del conjugado (>HRPO>color).

2.1.7. Lectura de placas

Los valores de absorbancia fueron medidos a 650nm utilizando un lector Labsystems®.

2.1.8. Cálculo de resultados

Para el cálculo del valor de *Cociente de Muestra Positiva* (M/P) de cada muestra se utilizó la siguiente formula:

$$M/P = \frac{\text{Muestra} - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$$

NC \bar{x} = media del control negativo; PC \bar{x} = media de control positivo

Las muestras fueron clasificadas como positivas, según cada punto de corte, cuando:

_ 10%DO → M/P ≥ 0,25

_ 20%DO → M/P ≥ 0,50

_ 40%DO → M/P ≥ 1,00

2.1.9. Resumen estadístico

Se calculó la media; mediana; cuartiles 0,05-0,25-0,75 y 0,95; y los valores extremos de los M/P de los sueros analizados en cada GRUPO de cachorras.

2.2. Bacteriología

2.2.1. Preparación de las muestras

Todas las muestras para bacteriología se analizaron dentro de las 48horas posteriores a su obtención.

Las muestras de MF fueron procesadas en *pooles* de cinco. En cada *pool* se utilizó una cucharita plástica para tomar las alícuotas de cada bolsa con muestra hasta constituir una masa total de 25gr por *pool*.

Para el procesamiento de los GMI se separó cada tejido linfático del resto del tejido adyacente, para después descontaminarla superficie del ganglio mediante la sumersión en alcohol etílico y posterior flameado. A continuación, los GMI de cada animal fueron cortados, con tijeras estériles, a los fines de reducir el tamaño de partículas de la muestra.

2.2.2. Pre-enriquecimiento no selectivo

Las muestras de MF (en pools de 5 muestras) y de GMI(10gr) fueron sembradas en un recipiente estéril con agua de peptona tamponada (APT), previamente atemperada a temperatura ambiente (22-25°C), en una dilución 1:10. Los recipientes fueron incubados durante un total de 18 ± 2 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en una estufa de cultivo.

En cada marcha bacteriológica, paralelamente al cultivo de las muestras se realizaron controles negativos y positivos. Como control negativo nada fue sembrado en los medios de cultivo, y como control positivo se utilizó una cepa de *S. Typhimurium* aislada de un cerdo que presentó un cuadro clínico de salmonelosis digestiva y que fue serotipificada por el I.N.E.I. “Dr. Carlos G. Malbrán”.

2.2.3. Enriquecimiento selectivo

En cada cultivo, se utilizó una micropipeta automática para transferir 100µl de APT a un tubo con 9,9ml de caldo Rappaport-Vassiladis (RV) cambiando la punta o tip estéril entre una muestra y otra. Los tubos de RV fueron incubados por 20-24 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en una estufa de cultivo.

2.2.4. Siembra en placas de agar selectivo

De cada tubo con caldo RV cultivado se sembró, en estrías por agotamiento, una placa de agar Verde Brillante (AVB) utilizando un ansa de 10µl. El cultivo de las placas se hizo en una estufa a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas.

2.2.5. Lectura de placas

La lectura de placas de AVB se realizó teniendo en cuenta el color de las colonias que crecen en su superficie.

2.2.6. Subcultivo de colonias sospechosas

Las colonias sospechosas se transfirieron a un medio sólido selectivo para Enterobacterias, agar Mc Conkey, para su aislamiento y purificación.

Las colonias purificadas fueron sometidas a pruebas metabólicas para identificar *Salmonella* spp. Los medios utilizados fueron: Agar hierro tres azúcares (TSI), Urea según Christensen, Agar Lisina Hierro (LIA), Citrato y la Prueba de la β -Galactosidasa (ONPG). Cada prueba fue procesada según métodos estandarizados para cada una de ellas.

2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Todos los aislamientos fueron confirmados como *Salmonella* spp. mediante la detección del gen *invA* por PCR.

2.3.1. Extracción de ADN

Dos colonias fueron levantadas de la placa de cultivo purificado (agar Mc Conkey) y resuspendidas en un tubo plástico estéril de 1,5ml, con 1ml de agua de calidad molecular. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados y al pellet se le realizó la extracción de DNA con el kit comercial DNAzol® (Invitrogen™, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, de la siguiente manera:

2.3.1.1. Se agregó 1ml de DNAzol en cada tubo y se mezcló con micropipeta.

2.3.1.2. Los tubos fueron centrifugados a 13.500rpm por 10 minutos a 4°C. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de 1,5ml, se agregó 500 μ l de etanol al 100% y se incubó por 2 horas a -20°C.

2.3.1.3. Se centrifugó a 14.000rpm por 4 minutos a 4°C, para luego descartar el sobrenadante. A continuación se agregó 1000µl de etanol al 75% y se invirtió el tubo de 3 a 6 veces.

2.3.1.4. Se centrifugaron los tubos a 13.900rpm por 4 minutos a 4°C, para luego descartar el sobrenadante y se agregó 1000µl de etanol al 75%.

2.3.1.5. Los tubos fueron centrifugados a 13.900rpm por 4 minutos a 4°C, y luego de descartar el sobrenadante, se dejó el tubo invertido abierto sobre papel tissue para que escurra.

2.3.1.6. Por último, se agregó en cada tubo 20µl de agua y se pipeteó hasta disolver el pellet. Las muestras se guardaron a -20°C, hasta el momento de procesarlo por PCR.

2.3.2. Preparación de reactivos

La PCR se realizó según protocolos propuestos por Malorny *y col.* (2003), con algunas modificaciones. La mix de reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción se constituyó de agua calidad molecular, 1,5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂), 0,2 mM de Desoxirribonucleótidos (dNTPs), 1U de enzima polimerasa termoestable (*Taq*. ADN polimerasa, Invitrogen™, CA, USA), 1X del buffer de la enzima y 0,4 mM de cada cebador. En cada batería de reacciones se agregaron controles positivos y negativos.

Para la detección del gen *invA*, se utilizaron los siguientes cebadores según Malorny *y col.*(2003a).

-CebadorF 139: GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA

-CebadorR 141:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC

Reactivos	Volumen 1 muestra (μl)	Concentración
H ₂ O	12,55	
Buffer 10X	2,5	1X
Cl ₂ Mg (50mM)	0,75	1,5 mM
dNTPs (2.5mM)	2	0,2 mM
CebadorF139 (10mM)	1	0,4 mM
Cebador R141 (10mM)	1	0,4 mM
Taq (5UI/μl)	0,2	1U/ensayo
DNA	5	
VOLUMEN FINAL	25	

Tabla 1: Concentración de reactivos por cada muestra analizada, para un total de 25μl finales que fueron ciclados (Malorny *y col.*, 2003a).

2.3.3. Ciclado

Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por un 1 min, seguido de 38 ciclos de 95°C por 30seg, 64°C por 30 seg y 72°C por 30 seg. Por último, se utilizó un periodo de extensión final a 72°C por 4 min.

2.3.4. Preparación del gel de agarosa

Se utilizó un gel de agarosa en una solución al 2% en buffer TAE 1X. La dilución completa del soluto se logró calentando la solución en horno microondas. La tinción del gel se realizó agregando 1µl de bromuro de etidio a la solución tibia, que luego fue colocada en el soporte, armado con su respectivo peine.

2.3.5. Electroforesis

El gel de agarosa se colocó en una cuba electroforética con buffer TAE 1X. Cada muestra fue sembrada en una proporción 5:1 con el buffer de siembra, es decir, se trabajó con 5µl de la muestra y 1µl de buffer de siembra. Cada 5 muestras se sembró un control negativo. Un control positivo fue sembrado al final de cada línea de siembra, seguido del marcador de peso molecular (100bp ladder, Invitrogen™, CA, USA).

La corrida electroforética para cada gel se realizó a 100 voltios por 30 minutos.

2.3.6. Observación de fragmentos

El desplazamiento de los fragmentos de ADN desde los pocillos hacia el polo positivo de la cuba electroforética dependió del peso específico de los mismos (tamaño). El ADN contenido en cada muestra fue teñido por el bromuro de etidio formando bandas coloreadas que se observaron a través de la colocación del gel en un transiluminador de luz UV (Cole Palmer).

El fragmento *invA* posee un tamaño de 285pb, por lo que se consideró positiva toda muestra donde se observó una banda aproximada a este peso molecular, y comparando la misma con la amplificada en el control positivo.

2.4. Serotipificación

Las cepas de *Salmonella* spp. aisladas fueron serotipificadas de acuerdo a la presencia de antígenos somáticos (O) y flagelares (H), clasificados en el Esquema de White-Kauffmann-Le Minor, del Instituto Pasteur, París, Francia. Se utilizaron antisueros producidos en el Servicio Antígenos y Antisueros, Instituto Nacional de Producción de Biológicos – ANLIS “Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina. Brevemente, el proceso de serotipificación se realizó por la prueba de aglutinación en lámina para la identificación del antígeno somático O, utilizando los antisueros polivalentes OSA y OSB. La detección de los antígenos flagelares H se hizo por aglutinación en tubo utilizando en primera instancia los cuatro antisueros flagelares polivalentes HS1, HSA, HSB y HSC, para luego enfrentarlo a los antisueros correspondientes al grupo polivalente. La identificación de los antígenos presentes permite formular un código que al ser ingresado en las tablas del Esquema de White-Kauffmann-Le Minor determina el serotipo de la cepa, por ejemplo: *Salmonella* Typhimurium 1, 4,5,12:i:1,2. Un esquema del flujograma de serotipificación de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, utilizado por el Servicio de Enterobacterias del INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán” se muestra en el ANEXO 2.

2.5. Subtipificación genética de cepas

Se obtuvieron los perfiles genéticos de las cepas de *Salmonella enterica* recuperadas de MF y GMI de las cachorras.

El estudio se realizó en los laboratorios del Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán” (Buenos Aires, Argentina), y se utilizó la técnica de Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) según el protocolo estandarizado de la Red PulseNet desarrollado por el CDC, USA (Ribot y *col.*, 2006) con la enzima *Xba*I (Invitrogen™, CA, USA).

2.5.1. Preparación de las cepas

Una vez conocido el serotipo, una colonia de cada cepa a analizar fue sembrada en Agar Tripticasa Soya (TSA) y cultivada a 37°C por 18 horas.

2.5.2. Preparación de *plugs*

Se realizó una suspensión de colonias de la placa de cada cepa en 1ml de buffer TE (Tris 100mM: EDTA 100mM). La concentración de las suspensiones bacterianas fue igualada utilizando un espectrofotómetro y llevándolas a una densidad óptica de 1,0. Se transfirieron 200µl de cada suspensión celular a tubos de 1,5ml y se les agregó 10µl de Proteinasa K (20mg/ml). Por último, 200µl de Agarosa SeaKem Gold 1% fundida y mantenida a 55-60°C fueron agregados a cada tubo. Luego de homogeneizar la mezcla, se rellenó un molde de *plug* para cada cepa analizada y se dejó solidificar a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.

2.5.3. Lisis celular

Los *plugs* fueron colocados en tubos de polipropileno y sumergidos en Buffer de lisis (TE 50mM, pH 8,0, 1% laurilsarcosina) con 25µl de solución de Proteinasa K

(20mg/ml). Los tubos se incubaron en baño termostático con agitación vigorosa (200rpm) a 55°C por dos horas.

2.5.4. Lavado de plugs

Una vez descartado el buffer de lisis, los *plugs* fueron sumergidos y lavados dos veces con agua calidad molecular a 50°C en baño termostático por 10 minutos. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados con 10ml de buffer TE (Tris 10mM: EDTA 1mM, pH 8,0) en baño termostático a 50°C por 10 minutos cada uno.

2.5.5. Digestión del ADN

Luego de ser cortados en porciones de 2mm, los *plugs* fueron colocados en criotubos. La digestión enzimática se realizó con 30U de la enzima de restricción *Xba*I (Invitrogen™, CA, USA) en buffer 1X por 18 horas en baño termostático a 37°C.

2.5.6. Preparación del gel de agarosa

Los *plugs* de las cepas fueron colocados en el peine, para después ser incluidos en el gel de Agarosa SeaKem Gold (SKG) al 1% en buffer Tris-Borato EDTA 0,5X. Los *plugs* de la cepa patrón *S. Braenderup* H9812 fueron sembrados en las calles 1, 5, 10 y 15 respetando el protocolo de PulseNet.

2.5.7. Electroforesis

La corrida de electroforesis se realizó con el equipo CHEF DR III, bajo las siguientes condiciones:

- Tiempo de pulso inicial A: 2,2 segundos.
- Tiempo de pulso final A: 63,8 segundos.
- Voltaje: 200V (6 volts/cm).
- Tiempo de corrida: 20 horas.

2.5.8. Tinción y documentación del gel

Una vez finalizada la corrida de electroforesis el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (1µg/ml) por 30 min. Posteriormente el gel fue enjuagado en agua destilada por 60-90 minutos, para luego ser analizado por el sistema de documentación Gel Doc 2000.

Para el análisis de la imagen del gel se utilizó el programa BioNumerics, v.4.0 (Applied Maths) aplicando los parámetros establecidos para la Red PulseNet Internacional.

3. Determinación de la prevalencia de infección en la progenie

En la segunda parición de las 4500 madres seleccionadas, se realizó un estudio longitudinal de los cerdos nacidos en tres semanas consecutivas (SEMANA 1, 2 y 3). En cada una de las 3 semanas, se tomaron muestras de sangre de 10 cerdos a los 10, 35, 56, 90, 120 y 150 días de vida. El n muestral se calculó para detectar *Salmonella* spp., a una prevalencia esperada de cerdos infectados del 25%, con un 95% de confianza (*WIN Episcopo 2.0*). En cada uno de los muestreos estas SEMANAS (a excepción de los 35 días de vida) se sacrificaron al menos 4 cerdos al azar y se tomaron muestras de GMI y CC.

3.1. Serología

Todos los sueros obtenidos de los cerdos de la progenie fueron procesados siguiendo la metodología descrita en el punto 2.1.

3.2. Bacteriología, PCR y Serotipificación

Los GMI y el CC (10gr) de cada animal necropsiado se procesaron siguiendo la metodología descrita en el punto 2.2. Los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron

confirmados por PCR según el punto 2.3 y serotipificados al igual que lo descrito en el punto 2.4.

3.3. Subtipificación genética de cepas

Se obtuvieron los perfiles genéticos de las cepas de *Salmonella enterica* recuperadas de CC y GMI de los cerdos necropsiados de la progenie y de una cepa de *S. Typhimurium* recuperada de un caso clínico en cerdos de recría en la granja, un año después de finalizado el estudio. Se utilizó la metodología descrita en el punto 2.5.

4. Comparación Genética

Se compararon los perfiles genéticos obtenidos por *Xba*I-PFGE de los aislamientos de *Salmonella entérica* de GMI y MF de los diferentes grupos de cachorras, con los aislamientos de la misma serovariedad en GMI y CC de la progenie. Además, se incluyó una cepa de *S. Typhimurium* aislada de un brote clínico de salmonelosis digestiva en cerdos de recría, de 50 días de vida aproximadamente, que se presentó en la granja de estudio un año después del último monitoreo de *Salmonella* realizado en la progenie.

RESULTADOS

RESULTADOS

Prevalencia de infección en las cachorras

La granja no reportó signos clínicos de diarrea en los cerdos, ni algún otro signo compatibles con salmonelosis, durante el tiempo en el que se desarrolló el trabajo.

Durante el estudio se analizaron por ELISA 936 de las 1000 muestras de suero de los 10 grupos de cachorras. En el Grafico 1 se muestran las medidas de resumen estadístico (media; mediana; cuantiles 0,05, 0,25, 0,75 y 0,95; y los valores extremos) de los MP de las 92 muestras de suero analizadas en cada GRUPO de cachorras.

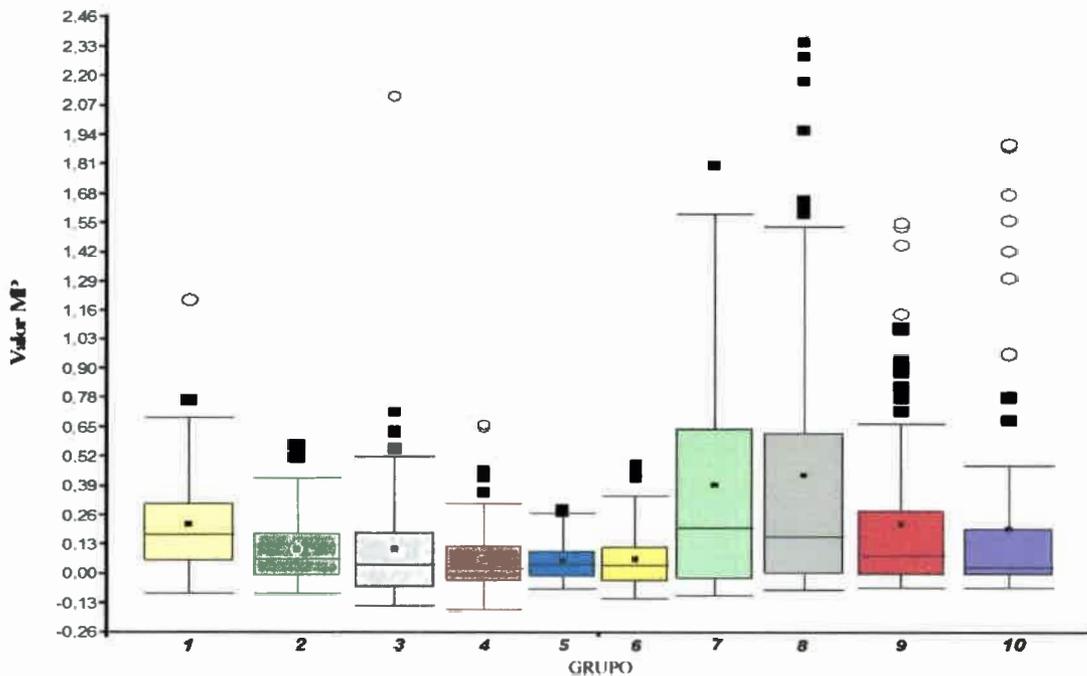


Gráfico 1: Descripción de los valores de *Cociente de Muestra Positiva* (MP) de las 92 muestras de suero analizadas en cada GRUPO de cachorras.

Los resultados para cada uno de los grupos se muestran en la Tabla 2. En total se hallaron 211 (22,93%), 97 (10,54%) y 43 (4,67%) sueros positivos a puntos de corte del 10%DO, 20%DO y 40%DO respectivamente (Tabla 2).

De las 719 muestras de MF tomadas a cachorras de 150 días en la granja (144 pooles), se aisló *Salmonellaenterica* en 2 pooles (1,4%) del GRUPO 7. Los aislamientos fueron identificadas como *S. Typhimurium* (1 pool) y *S. Schwarzengrund* (1 pool) (Tabla 2).

Se analizaron 236 GMI provenientes de 9 de los 10 grupos de cachorras en estudio, aislando *Salmonellaenterica* en 44 ganglios (18,6%). Las serovariedades más frecuentemente aisladas fueron *S. Schwarzengrund* (15), *S. Bredeney* (13), *S. Saintpaul* (4), *S. Derby* (3) y *S. Infantis* (2) (Tabla 2).

Los promedios de los resultados obtenidos en la determinación de la prevalencia de infección de las cachorras, calculados con sus respectivos errores estándar, se muestra en el Gráfico 2.

Grupo	%+ ELISA			MF %+	Serovariedades aisladas de MF (pooles)	GMI %+	Serovariedades aisladas de GMI(n° de aislamientos)
	10%DO	20%DO	40%DO				
1	36.96	9.78	0.00	0	-	8.3	<i>S. Bovismorbificans</i> (2)
2	11.96	2.17	0.00	0	-	0	-
3	19.57	6.52	1.09	0	-	s/d	s/d
4	10.87	2.17	0.00	s/d	s/d	27.0	<i>S. Saintpaul</i> (3); <i>S. Bredeney</i> (2); <i>S. Derby</i> (2); <i>S. Schwarzengrund</i> (2); <i>S. Typhimurium</i> (1)
5	4.35	0.00	0.00	s/d	s/d	12.0	<i>S. Infantis</i> (1); <i>S. Derby</i> (1); <i>S. Schwarzengrund</i> (1)
6	10.87	0.00	0.00	0	-	27.8	<i>S. Bredeney</i> (9); <i>S. Rissen</i> (1)
7	47.83	31,52	15.22	11.8	<i>S. Schwarzengrund</i> (1); <i>S. Typhimurium</i> (1)	16.7	<i>S. Bredeney</i> (2); <i>S. Saintpaul</i> (1); <i>S. Schwarzengrund</i> (1); <i>S. Sandiego</i> (1)
8	41.30	29.35	18.48	0	-	20.0	<i>S. Infantis</i> (1); <i>S. Schwarzengrund</i> (1)
9	29.35	14.13	5.43	0	-	25.7	<i>S. Schwarzengrund</i> (7); <i>S. Livingstone</i> (1); <i>S. subesp. I O (Rugosa)</i> (1)
10	19.57	9.78	6.52	0	-	11.1	<i>S. Schwarzengrund</i> (3)

Tabla 2: Resultados expresados en porcentuales (positivos/analizados), obtenidos por serología a diferentes puntos de corte, y bacteriología de GMI y MF para *Salmonella* spp. y serovariedades aisladas en GMI y MF en cada GRUPO de cachorras.s/d: sin determinar.

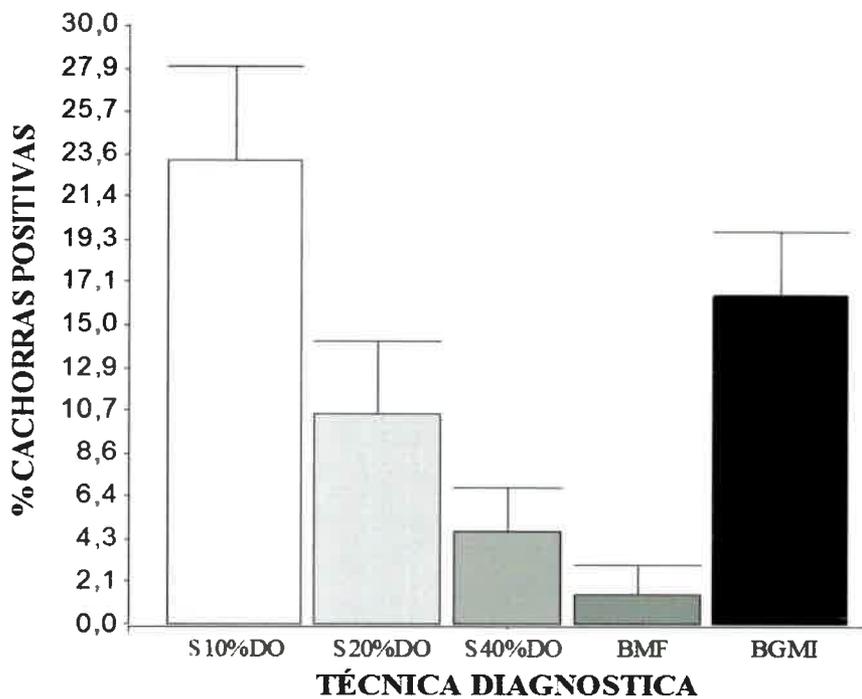


Gráfico 2: Promedio de la prevalencia de infección de *Salmonella* spp. en cachorras obtenidos por serología (ELISA) a diferentes puntos de corte (S10%DO, S20%DO, S40%DO) y bacteriología de MF (BMF) y GMI (BGMI).

El aislamiento de *S. Schwarzengrund* recuperado de MF de cachorras del GRUPO 7 (Figura 1, calle 3) presentó un perfil de PFGE indistinguible de aquellos correspondientes a los aislamientos de GMI de cachorras del mismo GRUPO (calle 1) y del GRUPO 9 (calle 2); mientras que el subtipo genético identificado en un aislamiento de GMI de cachorras del GRUPO 4 (calle 4) fue diferente, con más de siete bandas distintas (Figura 1).

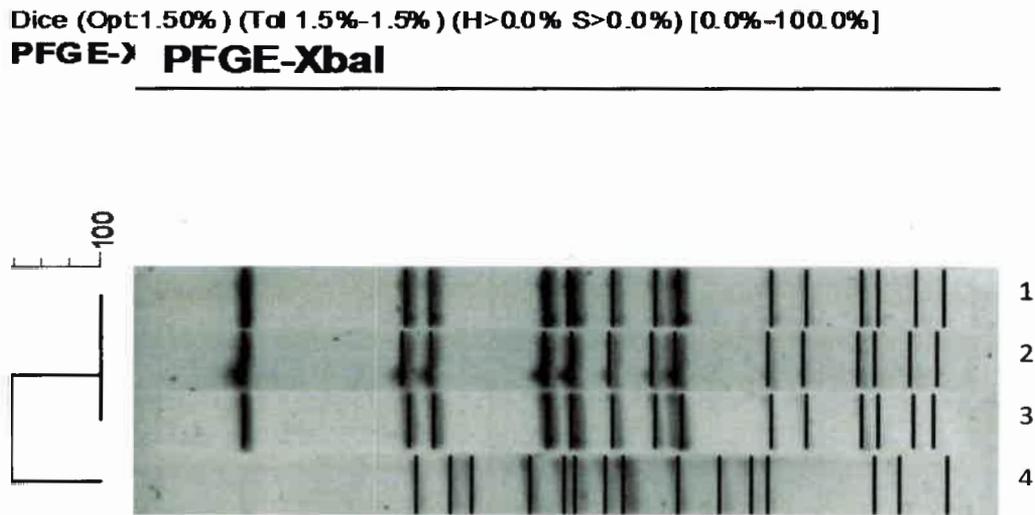


Figura 1: Dendrograma de relación genética de aislamientos de *S. Schwarzengrund* de los diferentes grupos de cachorras. PFGE con la enzima *XbaI*. Calles: 1 (GMI GRUPO 7), 2 (GMI GRUPO 9), 3 (MF GRUPO 7), 4 (GMI GRUPO 4). Calles 1 a la 4 correlativas de arriba hacia abajo.

Prevalencia de infección en la progenie

Se procesaron 180 sueros, provenientes de 6 edades diferentes en cada una de las semanas muestreadas (SEMANA 1, 2 y 3). En los Gráficos 3, 4 y 5 puede observarse el porcentaje de cerdos positivos para cada SEMANA según la edad de muestreo (en días de vida), respectivamente. El promedio de cerdos positivos en las tres semanas según la edad de muestreo se observa en el Gráfico 6.

En los tres muestreos se necropsiaron un total de 77 cerdos, distribuidos de la siguiente manera: 28 lechones de 10 días; 17 cerdos de 56 días; 10 cerdos de 90 días; 11 cerdos de 120 días y 11 cerdos de 150 días. Del total de animales sacrificados, se aisló *Salmonella enterica* de 2, 2 y 1 cerdos de 90, 120 y 150 días de vida respectivamente. Todos estos aislamientos fueron clasificados como *Salmonella* Derby y dos de las cepas fueron procesados por PFGE, donde se evidenció el mismo subtipo genético en ambas (Figura 2).

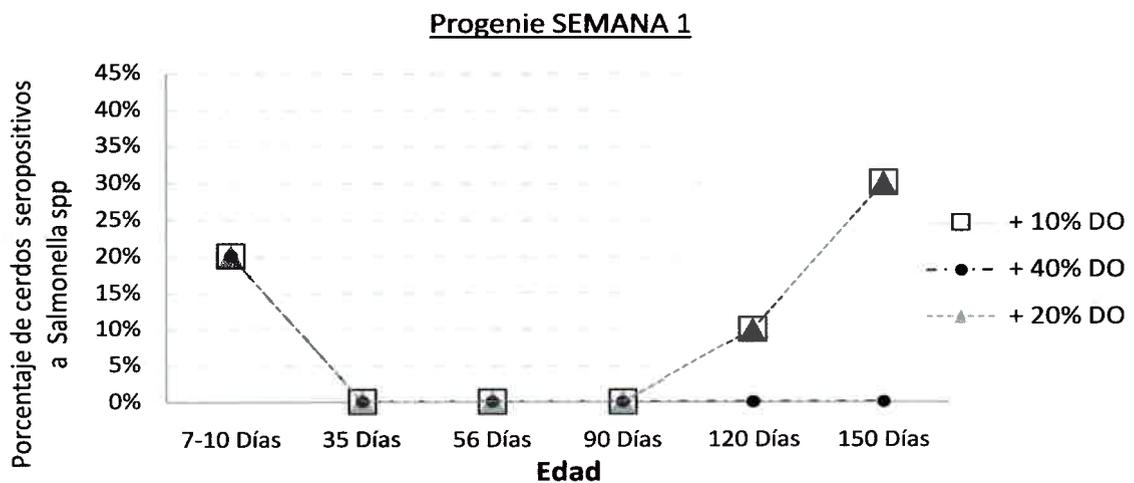


Gráfico 3: Seroperfil de la SEMANA 1 de progenie de la granja, obtenidos por la prueba de ELISA contra antígenos de *Salmonella* spp. a diferentes puntos de corte.

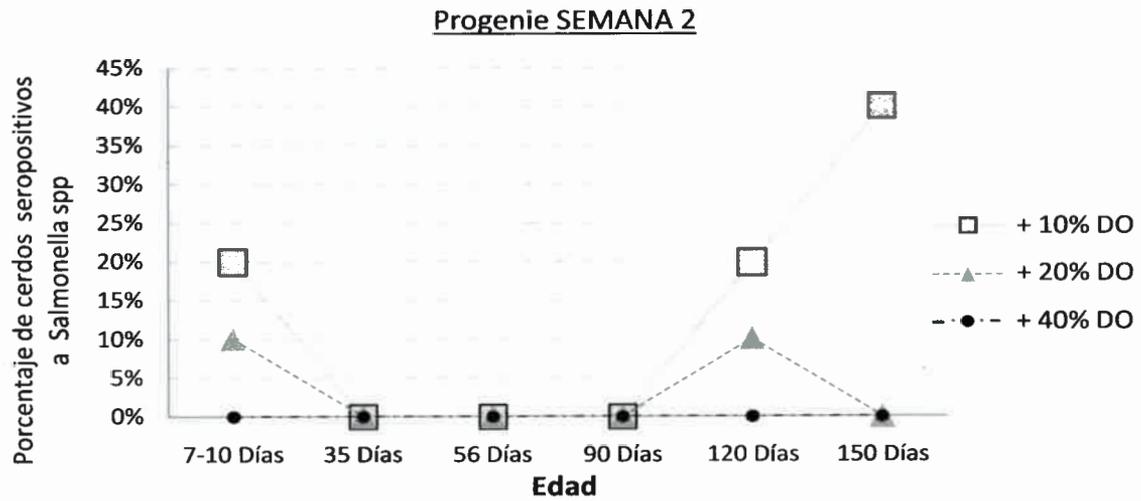


Gráfico 4: Seroperfil de la SEMANA 2 de progenie de la granja, obtenidos por la prueba de ELISA contra antígenos de *Salmonella* spp. a diferentes puntos de corte.

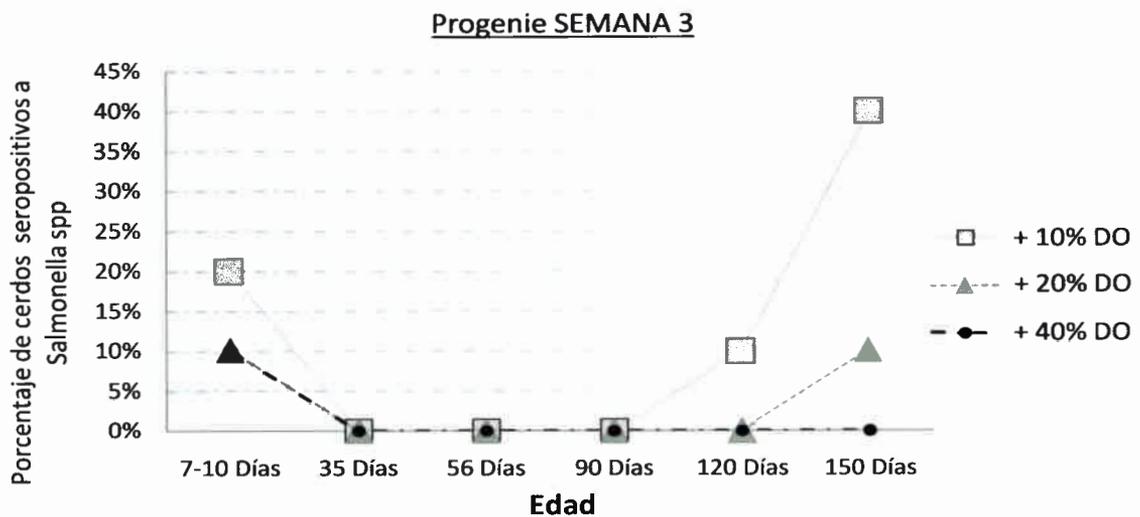


Gráfico 5: Seroperfil de la SEMANA 3 de progenie de la granja, obtenidos por la prueba de ELISA contra antígenos de *Salmonella* spp. a diferentes puntos de corte.

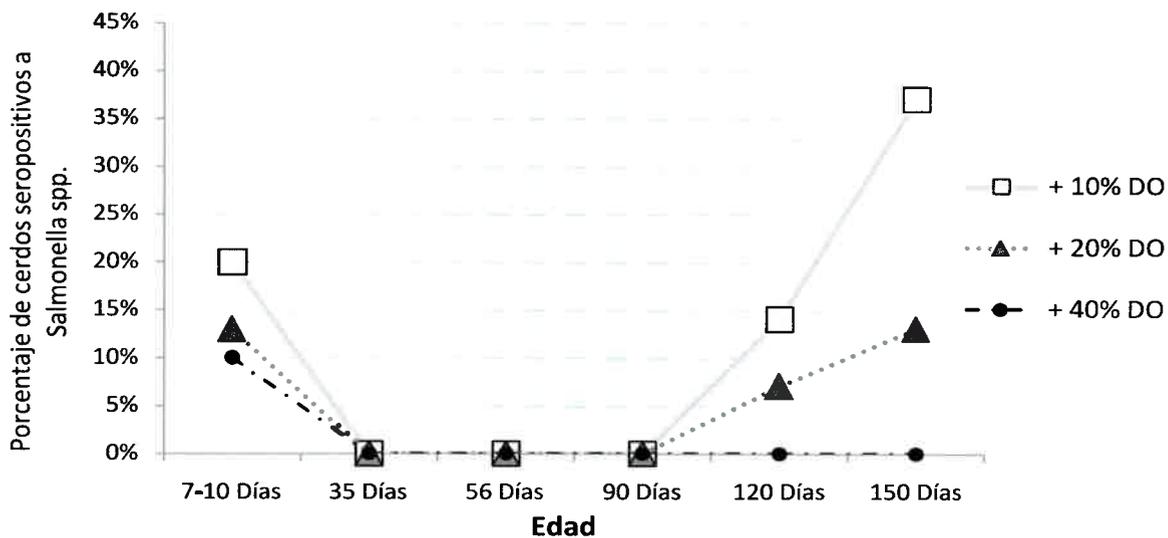


Gráfico 6: Seroperfil de la progenie de la granja obtenidos por promedio de las tres semanas de muestreo, utilizando la prueba de ELISA contra antígenos de *Salmonella* spp. a diferentes puntos de corte.

Comparación Genética

Las cepas de *S. Derby* aisladas de GMI de cachorras del GRUPO 4 (calle1) y GRUPO 5 (calle2), presentaron perfiles de PFGE diferentes entre sí y no relacionados con el correspondiente a los dos aislamientos de la progenie, que mostraron un mismo patrón de bandas entre si (calles 3 y 4) (Figura 2).

Dice (Opt:1.50%) (Td 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE-XbaI PFGE-XbaI

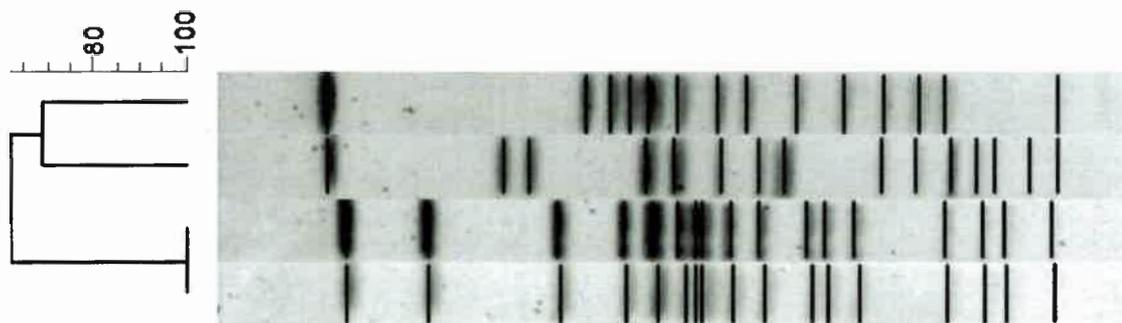


Figura 2: Dendrograma de relación genética de aislamientos de *S. Derby* aisladas de el GRUPO 4 y del 5 de cachorras y de la progenie. PFGE con la enzima *XbaI*. Calles: 1 (GMI GRUPO 4), 2 (GMI GRUPO 5), 3 (GMI SEMANA 3, 90 días de vida), 4 (GMI SEMANA 1, 120días de vida). Calles 1 a la 4 correlativas de arriba hacia abajo.

Las doscepas de *S. Typhimurium* analizadas por PFGE pertenecientes a la MF de cachorras del GRUPO7 ya los GMI de cachorras del GRUPO4, mostraron perfiles genéticos diferentes. Además, en la calle 3 se incluyó una cepa de *S. Typhimurium* aislada de un brote clínico de salmonelosis en cerdos de recría en la granja, un año después del último monitoreo de la progenie (Figura 3).

Dice (Opt1.50%) (Tot 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE-Xbal **PFGE-Xbal**

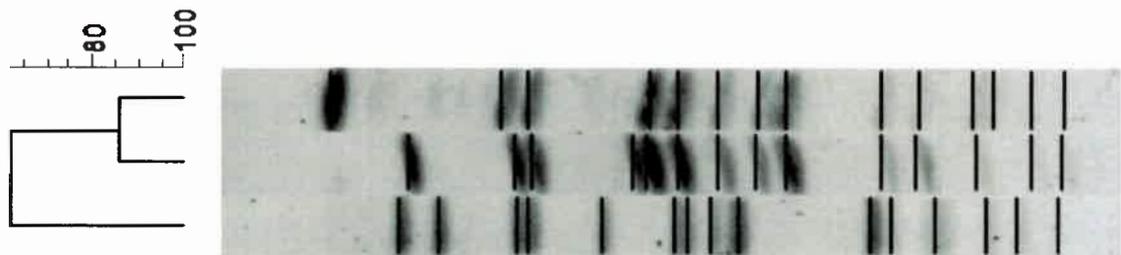


Figura 3: Dendrograma de relación genética de aislamientos de *S. Typhimurium* aisladas de GMI de cachorras del GRUPO 4 (calle 1) y de MF de cachorras del GRUPO 7 (calle 2). En la calle 3, *S. Typhimurium* aislada de un brote clínico de salmonelosis posterior al último muestreo. Calles 1 a la 3 correlativas de arriba hacia abajo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los programas mundiales en granjas porcinas implementados para disminuir la infección de *Salmonella* spp. en carne de cerdo, pueden verse afectados por el hecho de que los establecimientos reemplazan por año entre el 35 y 45% del total de sus madres a través de la incorporación de cachorras provenientes de empresas genéticas. Esto ha sido demostrado como un factor de riesgo importante en la dinámica de diferentes agentes patógenos del cerdo (Griffith y col., 2006), si bien no existe información concluyente sobre el papel de las cachorras en la introducción y diseminación de *Salmonella enterica* en la granja, tema que motiva este trabajo.

Prevalencia de Cachorras con Anticuerpos contra *Salmonella* spp.

El nivel de infección general de la granja puede calcularse si seguimos la metodología planteada por Alban y col. (2002) en el programa para el control de salmonelosis en cerdos en Dinamarca, para el cálculo del *índice serológico de Salmonella*, considerando que el primer mes esta constituido por las cachorras de los GRUPOS 1-4, el segundo mes por los GRUPOS 5-7 y el tercer mes por los GRUPOS 8-10, y utilizando un punto de corte de 20%DO, obtenemos un *índice serológico de Salmonella* de 34,53%. Este nivel de infección sería clasificado en el sistema danés como Nivel 1, considerado como “aceptable, bajo”. Por otro lado, al aplicar el sistema de clasificación alemán según Merle y col. (2011), el 4,67% promedio de muestras con valores por arriba del punto de corte de 40%DO ubica a esta granja dentro de la Categoría I (0-20%).

Si bien la media de cachorras seropositivas fue del 10,54% (20%DO), esta varió en las diferentes GRUPOS entre el 0 y el 31,52% de los animales analizados. Esta gran

variabilidad coincide con lo encontrado por Kranker *y col.* (2003) y Rostagnoy *col.* (2012), y sugeriría una prevalencia particular para cada lote de animales dentro de una granja, lo que podría indicar una dinámica de infección que determina que cada GRUPO se constituya en una subpoblación dentro del total de animales. Por otra parte, el promedio de valores MP, fue aumentando y mostró mayor dispersión con los sucesivos GRUPOS, lo que podría deberse a que a medida que transcurría el tiempo las cachorras se exponían a un ambiente con mayor carga bacteriana, y por lo tanto, que posibilitaba la infección y transmisión de *Salmonella* spp. en un mayor número de animales, lo que se vio reflejado en la aparición de anticuerpos.

Prevalencia de Cachorras Eliminadoras de *Salmonella enterica*.

Según la metodología implementada para la detección de *Salmonella* spp. en la granja, la bacteriología permitió detectar cachorras de 150 días de vida que arrojaban *Salmonella enterica* en sus heces. Sin embargo, es difícil determinar si esta metodología realmente reflejó la cantidad de cachorras eliminadoras de *Salmonella enterica* en heces. Por un lado, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos por Arnold & Cook (2009) en granjas del Reino Unido, sobre el uso de *pooles* de materia fecal para determinar la prevalencia de infección en una granja, los autores reportaron que la proporción de *pooles* positivos al cultivo de *Salmonella enterica* fue mayor que la proporción de muestras positivas procesadas individualmente en ese trabajo. Esto tiene sentido, ya que la presencia de una muestra positiva dentro de un *pool* debería clasificar como positivo dicho conjunto de muestras, y de la misma manera, al agrupar muestras se disminuye también el número total de repeticiones, por lo que el porcentaje de muestras positivas sobre el total de repeticiones aumentaría. Con lo cual podemos inferir que el porcentaje

de cerdos positivos estaría siendo sobreestimado.

Por otro lado, es importante considerar los resultados reportados por Guenther y col. (2010), en un trabajo donde evaluó la interacción de *Salmonella enterica* y otras Enterobacterias durante infecciones experimentales subclínicas de *S. Typhimurium* (DT104). En ese trabajo, a partir de la infección de 40 lechones y el posterior sacrificio de estos a las 3hs, 24hs, 72hs y 28 días posinfección, para luego tomar muestras del contenido y la mucosa del yeyuno y del colon, los autores realizaron un seguimiento bacteriológico de las poblaciones de Enterobacterias presentes en el intestino de esos cerdos. Según los autores, no se observó efecto protector de las poblaciones de *E. coli* u otras Enterobacterias para la infección de *S. Typhimurium*, sino mas bien una correlación entre el aumento en el conteo de *S. Typhimurium* y el de otras Enterobacterias, sumado a un alto número de *S. Typhimurium* en mucosas con recuentos aumentados de *E. coli* adherida a la misma. Esto sugiere que cada población de Enterobacterias soporta la aparición de otras poblaciones, o bien, que el ambiente intestinal influye en el crecimiento de todas las poblaciones de Enterobacterias por igual, por lo tanto, es lógico pensar que la dilución de una muestra positiva, que de por si posee altas cargas de otras Enterobacterias, en otras muestras de materia fecal durante el armado de pooles, puede llevar a falsos negativos por enmascaramiento de *Salmonella enterica* por la gran cantidad de otras Enterobacterias. En este caso, el uso de *pooles* podría llevar a subestimar el porcentaje de cerdos positivos, como bien ha sido planteado también por Arnold y col. (2011).

En definitiva, si tomamos entonces el número de *pooles* positivos sobre el total de *pooles* procesados, podemos estimar que la cantidad de cachorras que arrojaban *Salmonella enterica* en sus heces fue inferior al 1,4%. Si bien se trata de una estimación,

este valor es similar al reportado por Funk y col. en 2001 (1,1%) y Penmetchsa y col. en 2009 (2,2%). Es interesante destacar que en el trabajo de Penmetchsa y col. (2009), los autores trabajaron en dos granjas de los Estado Unidos, una de 3500 madres y otra de 6000 madres, que habían tenido antecedentes de salmonelosis, sin embargo, encontraron que la cantidad de cerdas que eliminaban *Salmonella enterica* en su materia fecal fue tan bajo como en este trabajo, donde se trabajó con una granja nueva que no reportó cuadros clínicos de salmonelosis. Si bien los autores tomaron un número significativo de muestras (454) y las procesaron en forma individual, la diferencia podría estar en el protocolo de toma y procesamiento de muestras, ya que en ese trabajo cada muestra analizada fue de sólo 1gr de materia fecal.

Según Funk y col. en 2000, en un estudio sobre el efecto del peso de la muestra de materia fecal en la sensibilidad del cultivo bacteriológico para la detección de *Salmonella enterica*, donde trabajaron con muestras clínicas de hisopados rectales y heces en alícuotas de 1gr, 10gr y 25gr, los autores reportaron que ningún animal fue positivo con los hisopados rectales, mientras que el 13,7%, 26,1% y 28,1% de las muestras fue positiva teniendo en cuenta alícuotas de 1gr, 10gr y 25gr respectivamente. Se puede ver entonces que las muestras de 1gr disminuyen la sensibilidad de la técnica bacteriológica, mientras que no existen diferencias significativas en trabajar con 10gr o 25gr de materia fecal. Esto podría explicar la baja proporción de cerdas que arrojaban *Salmonella enterica* en materia fecal encontrada por Penmetchsa y col. (2009) en unagranjas con antecedentes clínicos de salmonelosis, encontradas a partir de muestras de 1gr de materia fecal e hisopados del piso de los corrales.

Otra interpretación podría darse si tenemos en cuenta que la cantidad de cachorras que presentaron anticuerpos contra *Salmonella* spp. en este estudio fue mayor al de

aquellas que arrojaban *Salmonella enterica* en MF, lo que supone que la prevalencia de animales infectados en la población sería más alta. Los resultados bacteriológicos podrían deberse a lo planteado por Funk y col. (2000), sobre la escasa posibilidad de detección de *Salmonella enterica* en la materia fecal de animales portadores, debido a que la eliminación del patógeno en las heces de estos animales sería escasa y heterogénea dentro de una misma muestra. A esto debemos sumarle los reportes de Nielsen y col. en 1995 y Oliveira y col. en 2010 sobre la intermitencia en el arrojamiento de *Salmonella enterica* en MF de animales infectados experimentalmente.

Prevalencia de Cachorras Positivas a *Salmonella enterica* en Frigorífico

En el muestreo en frigorífico realizado en este trabajo puede observarse que uno de cada cinco muestras de tejido (GMI) de cerdos faenados fue positivas a *Salmonella enterica*. Dado que esos animales fueron destinados a la venta como subproductos del cerdo, podemos evidenciar lo planteado por Plym Forshell & Wierup (2006) sobre el riesgo de los animales como fuente posible de contagio de salmonelosis no-tifoidea para los consumidores de este tipo de productos. Sin embargo, al no contar en la Argentina con estudios estadísticos sobre la salmonelosis en humanos, como los realizados por Voetsch y col. (2004) en los Estados Unidos, por Ramos Moreno y col. (2008) o los reportes epidemiológicos de la EFSA en la UE, no podemos dimensionar el impacto de la contaminación de las canales de cerdo en la Salud Pública en la Argentina.

Basándonos en el muestreo en frigorífico independientemente del origen de los animales, podemos decir que el 18,6% de cerdos con aislamiento positivo de *Salmonella enterica* en GMI coincide con los valores de prevalencia reportados en la UE en el informe publicado por el EFSA Journal en 2008 (Anonymous, 2008a y b). Según estos informes, la prevalencia obtenida en el presente trabajo puede equipararse con la de

Italia (16,5%), Bulgaria (16,7%), Francia (18,1%) o el Reino Unido (21,2%); siendo inferior a la prevalencia reportada en Portugal (23,4%), Grecia (24,8%) y el valor más alto en la UE representado por España (29%) (Anonymous, 2008a). No obstante, es importante recalcar que, si bien se realizaron múltiples muestreos con un número de muestras significativo, los datos de este trabajo son el resultado del análisis de una sola granja, en un solo frigorífico.

Salmonella Schwarzengrund, la serovariedad de mayor frecuencia de presentación en este estudio, significó solo el 0,15% de los aislamientos de *Salmonella enterica* en GMI reportados en el informe de la UE del 2008, habiendo sido aislada sólo en Francia, donde representó el 1,9% del total de aislamientos en GMI de ese país (Anonymous, 2008a). Por otra parte, de las principales serovariedades reportadas por la UE en 2008, solo *S. Enteritidis* y *S. Anatum* no fueron aisladas en este estudio. El caso de *S. Enteritidis* puede deberse a que en Argentina esta variedad ha sido encontrada principalmente en aves, según lo reportado por Caffer y col. (2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan información preliminar sobre la situación de *Salmonella enterica* en cerdos en Argentina. Por ejemplo, el porcentaje de cerdos infectados en frigorífico (18,6%), obtenidos de la bacteriología de GMI, es levemente inferior al 21,2% reportado por Ibar y col. (2009) en GMI de cerdos faenados en cuatro diferentes frigoríficos de Argentina, es decir, los valores son muy similares. La diferencia podría estar relacionada al menor número de muestras procesadas por Ibar y col. (2009), que fue de 193 cerdos, con respecto a este trabajo donde se muestrearon 236 cerdos.

De las serovariedades de *Salmonella enterica* de origen animal reportadas por

Caffer y col. (2007) en Argentina, sólo *S. Typhimurium* fue encontrada en este trabajo. Sin embargo, el hecho de que *S. Schwarzengrund* fue la serovariedad de mayor presentación en los cerdos de este trabajo, con el 34% del total de aislamientos de *Salmonella enterica* de los GMI de cerdos faenados, coincide con los resultados obtenidos por Ibar y col. (2009) en frigoríficos de Argentina. Los autores reportaron que el 27% de los aislamientos fue clasificado como *S. Schwarzengrund* mientras que el resto fue identificado como *S. Heidelberg* (17%), *S. subesp. I (6,8:e,h:-)* (13%), *S. Derby* (10%), *S. Bredeney* (8%) y *S. Typhimurium* (7%).

Por otro lado, las serovariedades *S. Typhimurium* y *S. Infantis* reportadas por Caffer y col. en el 2007 como dos de las tres serovariedades de mayor frecuencia de presentación en cuadros clínicos en humanos, también fueron aisladas de muestras de cerdos en frigorífico en este trabajo. Si bien representaron porcentajes mínimos del total de aislamientos de *Salmonella enterica*, su presencia en cerdos plantea la posibilidad de infecciones cruzadas entre humanos y cerdos. La similitud entre las serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas de casos clínicos en humanos con aislamientos de cerdos coincide con lo encontrado por Vo y col., (2006) en Vietnam, donde los autores proponen que el cerdo representa una de las fuentes de infección de salmonelosis notifoidea en el hombre en ese país asiático. Aunque de estas dos, sólo *S. Typhimurium* fue reportada como importante por los autores, quienes agregaron *S. Anatum* y *S. Weltevreden* como las variedades de mayor circulación en Vietnam, las que, hasta donde se conoce no han sido aisladas en Argentina.

La cantidad de cerdos infectados en la línea de faena y los serotipos aislados en este estudio, sumada a la información aportada por Ibar y col. (2009), debería plantear la necesidad de implementar alguna de las metodologías para el control de contaminación

de canales en frigorífico propuestas por Lawson y col. en 2009, como son el uso de agua caliente, la combinación de vacío con vapor de agua, el uso de ultrasonido o de ácido láctico. Sin embargo, debe considerarse que este trabajo refleja la situación en una sola granja porcina, por lo que futuros trabajos son necesarios para contar con información más representativa de las granjas del país y del riesgo que representa el cerdo en la aparición de casos de salmonelosis no-tifoidea en Argentina.

Es importante destacar que este trabajo se realizó en una granja nueva, que no presentó signos clínicos compatibles con ninguno de los cuadros de salmonelosis durante el periodo de estudio. Es por esto que el 18,6% de cerdos infectados por *Salmonella enterica* detectados en frigorífico parece ser alto para las condiciones de la granja.

En este sentido, si bien Côté y col. en 2004, al comparar la contaminación de carcasas con *Salmonella* spp. en cerdos que venían de granjas con antecedentes de salmonelosis con granjas sin antecedentes, encontraron asociación estadística entre granjas con antecedentes clínicos y altos niveles de contaminación de carcasas en matadero; no hubo diferencia en el porcentaje de GMI o CC positivos a *Salmonella* spp. entre granjas con antecedente clínicos y sin antecedentes. Además, los autores reportaron que el porcentaje de contenidos cecales positivos a *Salmonella* spp. (53,11-50,13%) fue mucho mayor al de GMI (15,02-16,45%) para el grupo con antecedentes con respecto al grupo sin antecedentes. Esto coincide con lo encontrado por Ibar y col. (2009) en Argentina, donde también las muestras de contenido de ciego de los animales faenados resultaron en un mayor número de muestras positivas, con respecto al de GMI. La diferencia en el porcentaje de muestras positivas, podría estar indicando contaminaciones recientes detectadas solo a nivel de la luz intestinal, lo que representa

un dato interesante que no puede ser evaluado en el presente trabajo debido a que no se tomaron muestras de CC en los cachorras faenadas.

Sin embargo, la gran cantidad de serovariedades recuperadas de muestras de frigorífico, 11 en total, que no fueron aisladas en las muestras de materia fecal tomadas a los cerdos en la granja, coincide con los resultados encontrados por Magistrali *y col.* en 2008, en un trabajo donde estudiaron la dinámica de la infección de *Salmonella enterica* en una granja de engorde en Italia. Para ello, los cerdos fueron monitoreados desde su entrada a la granja hasta su salida a faena, durante el transporte, estadía y posterior sacrificio en el frigorífico. Según los autores, *S. Typhimurium* fue la principal serovariedad aislada de los animales dentro de la granja, mientras que en el frigorífico se recuperaron siete serovariedades, donde *S. Hadar* y *S. Bredeney* fueron las variedades que representaron la mayor cantidad de aislamientos en GMI y CC. Sumado a esto, las serovariedades aisladas de muestras en el frigorífico coincidieron con las que recuperaron de muestras tomadas del ambiente de los camiones de transporte antes de ser cargados, por lo que proponen al transporte como una de las principales fuentes de infección/contaminación de los cerdos. Esto coincide con Erdman *y col.* (2003) y Vyt *y col.* (2006) quienes proponen que los corrales de espera constituyen una muy importante fuente de contaminación ambiental del frigorífico, sobre todo cuando los tiempos de transporte y espera de los animales son extensos. Mannion *y col.* (2012) incluyen además a la rutina de faena y los operarios en la contaminación de las canales dentro del frigorífico.

De lo anterior, sumado a que la mayoría de serovariedades recuperadas de GMI en este trabajo son frecuentemente clasificadas como “ambientales”, podemos suponer una infección y/o contaminación de las cachorras durante el transporte a frigorífico, el

periodo de espera o durante la faena de estos animales. Sobre todo debido al escaso tiempo necesario para la detección de *Salmonella enterica* en diferentes tejidos luego de su ingestión, que según Loynachan & Harris (2005) sería de tres horas. Si bien, los autores reportaron la dificultad de que estas infecciones ocurran durante la estadía en frigorífico, ya que, se necesitarían altas concentraciones ambientales de *Salmonella enterica* para lograr la infección de los cerdos expuestos, es importante tener en cuenta que las cachorras de este trabajo fueron faenadas en un frigorífico ubicado a más de 400 km de la granja, por lo que los tiempos de transporte y estadía fueron naturalmente extensos, lo que favorecería la posibilidad de infección/contaminación.

Prevalencia de Infección en las Cachorras

Para evitar el posible sesgo al considerar la cantidad de cerdos infectados en la faena (18%) y sobreestimar el nivel de infección de los cerdos de la granja, conviene observar también los resultados obtenidos por serología de las cachorras, donde, el promedio general de cerdas con serología positiva a *Salmonella* spp. en toda la población fue del 10,54%, utilizando un punto de corte de 20%DO. La diferencia porcentual entre la cantidad de animales clasificados como positivos por ambas metodologías diagnósticas, coincide con lo planteado por Nollet y col. (2005a), en un trabajo donde analizaron 60 granjas en Bélgica para determinar la cantidad de cerdos con aislamientos positivos de *Salmonella enterica* en GMI tomados en frigorífico, que eran positivos a la serología de *Salmonella* spp. en muestras de sangre, tomadas también en frigorífico. Los autores reportaron que la utilización del punto de corte del 20%DO tuvo una sensibilidad relativa del 59,7%, es decir, que sólo el 59,7% de los animales positivos a la bacteriología de GMI en frigorífico fueron también positivos al ELISA

(Idexx) con un punto de corte del 20%DO.

En otras palabras, si consideramos lo propuesto por Nollet *y col.* (2005a), sumado a que trabajaron con el mismo kit diagnóstico de este estudio, y le asignamos al ELISA una sensibilidad relativa del 59,7%, podemos inferir que del 18% de cerdas positivas a GMI en frigorífico, la serología debería haber clasificado alrededor del 11,1% de animales como positivos, valor que es muy similar al promedio de cerdas positivas de las 10 grupos, si tomamos el 20%DO como punto de corte.

No obstante, al considerar todos los resultados de granja en comparación con el frigorífico de este trabajo, podríamos inferir que la diferencia entre positivos a serología y a bacteriología estaría relacionada a la infección/contaminación de los animales en frigorífico, más que a la falta de reacción inmunológica en algunos animales propuesta por Nollet *y col.* (2005a). También es cierto que los tiempos de transporte y espera en frigorífico fueron menores en aquel estudio, 1,7hs de transporte y 3,1hs de espera promedio, lo que disminuiría la probabilidad de infección fuera de la granja.

De los resultados obtenidos, y coincidiendo con Kranker *y col.* (2003), puede evidenciarse la dificultad de establecer la importancia de la infección de los cerdos por *Salmonella* spp. en una granja mediante el uso de una sola de las técnicas diagnóstica. Por ejemplo, si bien Nowak *y col.* (2007) en un estudio comparativo entre serología de jugo de carne y PCR de ganglios mesentéricos y contenido de yeyuno, propuso que el uso de un ELISA con un punto de corte de 20%DO es preciso para identificar los animales que eliminan *Salmonella enterica* en sus heces dentro de una población, en este trabajo se observó una relación directa entre el número de cachorras seropositivas a una línea de corte del 40% DO, con el aislamiento de *Salmonella enterica* en

MF(GRUPO7). Estas discrepancias podrían deberse a la diferencia de sensibilidad entre la PCR y la técnica bacteriológica utilizada en este trabajo.

Por otro lado, el aislamiento de *S. Typhimurium* en las heces del GRUPO7 podría también estar relacionado a niveles de anticuerpos más altos y perdurables con respecto a otras serovariedades como *S. Schwarzengrund*, que fue recuperada de MF en este mismo GRUPO y fue la serovariedad más frecuentemente aislada en GMI de las cachorras en frigorífico. La diferencia en la magnitud de respuesta según la serovariedad que produce la infección coincidiría con lo ya reportado por varios autores (Nielsen y col., 1995; Stege y col., 2000; Baum y col., 2005; Baptista y col., 2009). No obstante, en el GRUPO8 también se encontraron niveles altos de seropositivos al 40%DO, aunque no se logró aislar *Salmonella enterica* de la materia fecal de ninguna de sus cachorras, lo que podría explicarse con la variabilidad en la sensibilidad de la técnica bacteriológica planteada por Funk en 2003.

A partir de la dispersión de valores M/P en los sueros de las cachorras de los GRUPOS 7 y 8, donde en ambos casos alrededor del 30% de los sueros fueron positivos a un punto de corte del 20%DO ($MP \geq 0,5$), puede sugerir la presencia de un brote de salmonelosis en la granja que no fue detectado. Esto coincide con lo encontrado en la comparación de serotipos y genotipos que se realizó, ya que si bien la serovariedad *S. Schwarzengrund* fue aislada en GMI en seis de nueve GRUPOS analizados, solo los aislamientos obtenidos a partir del GRUPO 7 en adelante coinciden con el genotipo aislado en la granja. Esto podría indicar que el primer brote de salmonelosis en la granja habría sido en el GRUPO 7 y posteriormente en el 8, y que habría sido producido por la serovariedad *S. Schwarzengrund*, lo que explicaría la falta de síntomas clínicos evidentes.

La tipificación genética de los aislamientos de *Salmonella enterica* por la técnica de PFGE utilizada en este trabajo, permitió identificar la presencia de distintos subtipos genéticos de *S. Typhimurium* conjuntamente con el aislamiento de un mismo subtipo genético de *S. Schwarzengrund* en la materia fecal de las cachorras en granja y en los GMI de las cachorras descartadas en frigorífico. Según el análisis de Foley *y col.* en 2009, el aislamiento del mismo subtipo genético de *S. Schwarzengrund* en varios animales podría indicar la ocurrencia de un brote de salmonelosis en la granja que no pudo ser diagnosticado clínicamente, o bien una fuente común de infección.

De esta manera, si tenemos en cuenta la ausencia de reportes de alguno de los síntomas clínicos descritos por Griffith *y col.* (2006) y Brown *y col.* (2007) compatibles con cuadros clínicos de salmonelosis, los resultados obtenidos por serología y bacteriología de MF de animales en la granja, sumado a que el serotipo más prevalente en los GMI en frigorífico también fue encontrado en las heces de cachorras en la granja, y además, con similitud de genotipo, podemos inferir que se trataría de una granja donde las cachorras estarían infectadas por *S. Schwarzengrund* con cuadros subclínicos, y las cerdas portadoras podrían ser detectados mayormente a nivel de frigorífico (GMI).

Prevalencia de Infección en la Progenie

La metodología aplicada para la detección de cerdos infectados dentro de la progenie permitió recuperar *Salmonella enterica* y clasificar los aislamientos según la serovariedad, en muestras de cerdos de diferentes edades. Además, se logró estimar una dinámica poblacional de las infecciones mediante el seguimiento de tres subpoblaciones (SEMANAS) de cerdos que fueron muestreadas en seis edades diferentes y evaluadas mediante el uso de la técnica serológica de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Salmonella spp.*

Si bien Gooch & Haddock (1969) y Wilcock *y col.* (1976) plantean que la salmonelosis producida por serovariedades de *Salmonella enterica* se presenta principalmente en cerdos durante el postdestete, aproximadamente a los 50 días de vida, en este estudio se pudo detectar que los cerdos comenzaron a eliminar *Salmonella enterica* en sus heces a partir de los 90 días de vida. Sumado a esto, la aparición de cerdos que seroconvirtieron hasta llegar a niveles detectables por la técnica de ELISA utilizada, alrededor de los 120 días de vida, puede pensarse que, en este caso, el inicio de la fase de engorde fue el periodo donde se produjo la infección de los animales por *Salmonella enterica*. Esto coincide con lo hallado por Silva *y col.* (2006) y Vigo *y col.* (2009) que reportaron el inicio de la fase de engorde como el periodo crítico en la transmisión de salmonelosis. En cambio, difiere con Kranker *y col.* (2003) quienes, si bien no encontraron lechones positivos a la bacteriología de MF en la maternidad, la cantidad de cerdos positivos aumentó rápidamente en la recría hasta llegar al pico de eliminadores que se dio a los 63 días de vida, luego disminuyendo gradualmente hasta el final de la etapa de recría. Según sus resultados, los autores proponen que la principal transmisión se daría en forma horizontal en recría, y que esto estaría relacionado al estrés que se generaría en los cerdos posdestete y que predispondría a los animales a nuevas infecciones.

De la misma manera, sería lógico pensar que en una granja de sitios múltiples, el pasaje de los animales desde el sitio de recría al sitio de engorde podría generar en los cerdos una situación de estrés que podría tener los mismos resultados en la predisposición a nuevas infecciones. Esto coincide con lo encontrado por Hautekiet *y col.* (2008) sobre los factores de riesgo a tener en cuenta para la categorización de granjas, donde los autores encontraron correlación directa entre deficiencias en la

ventilación y regulación de temperatura, lo que definen como estrés térmico, en los galpones de engorde con alta seroprevalencia de *Salmonella* spp. en los cerdos. Al mismo tiempo, asociaron la baja asignación de espacio por animal con mayores valores de M/P en el ELISA de esos animales, lo que también proponen se debería a mayores niveles de estrés.

Partiendo de lo anterior, y al analizar el seroperfil de la progenie, vemos que a los 10 días de vida el 20% de los lechones presentaban niveles detectables de anticuerpos a un 10%DO, siendo el 10% de lechones positivos a un 40%DO. La detección de anticuerpos contra *Salmonella* spp. en lechones tan jóvenes, coincidiría con lo planteado por diferentes autores como resultado del pasaje por inmunidad pasiva de las madres a los lechones (Nielsen y col., 1997; Proux y col., 2000; Lurette y col., 2008). Si bien, la cantidad de animales seropositivos encontrados en la primera semana de vida es inferior a la reportada por Proux y col. (2000), donde encontraron que hasta el 100% de los lechones fueron seropositivos con altos valores de DO. Esto podría ser explicado por el hecho de que los autores se basaron en la progenie de cerdas con alta concentración de anticuerpos en una granja con infecciones clínicas por *S. Typhimurium*, lo que determinaría una mayor prevalencia de cerdas seropositivas y un mayor pasaje de anticuerpos a la progenie.

Siguiendo con el seroperfil en este estudio, los sueros de los cerdos de 35, 56 y 90 días de vida, no presentaron niveles detectables de anticuerpos contra *Salmonella* spp., lo que indicaría la falta de exposición de estos animales al agente o una falta de respuesta inmunológica detectable, que según Nielsen y col. (1995) y Oliveira y col. (2010) se daría a partir de los 14 días posinfección. Este bache inmunológico detectado a partir de los 35 días de vida no coincide con las seis semanas de protección por

inmunidad pasiva encontradas por Proux *y col.* en 2000, aunque nuevamente los antecedentes y el serotipo presente en esa granja, podría explicar la mayor inmunidad pasiva que lleve a una protección más duradera.

El aislamiento de *S. Derby* en la progenie al inicio de la etapa de engorde y la aparición de niveles detectables de anticuerpos en el segundo muestreo realizado en esa etapa, indicaría que los animales se exponían a esta serovariedad alrededor de los 90 días de vida, desarrollando una respuesta inmunológica activa y específica detectable alrededor de los 120 días de vida. A pesar de esto, es interesante señalar la ausencia de cerdos seropositivos al 40%DO en todas las semanas muestreadas en la progenie, lo que podría explicarse por la baja respuesta serológica producida por el serotipo aislado (*S. Derby*), aunque, puede haber sido influenciado también por el bajo número de muestras tomadas de la progenie en este estudio.

Si bien no se encontraron trabajos específicos sobre la respuesta inmune de *S. Derby* en cerdos, según Oliveira *y col.* en 2010 en un trabajo donde infectaron experimentalmente a lechones de 21 días con *S. Panama*, reportaron la aparición de diarrea conjuntamente al aislamiento de la bacteria en MF y en diferentes órganos de los animales infectados, pero no encontraron niveles detectables de anticuerpos en ninguno de los lechones durante todo el periodo posinfección. Sin embargo, hay que tener en cuenta que todos los cerdos fueron sacrificados 14 días posteriores a la infección para la toma de muestra de órganos para bacteriología, por lo que el periodo de respuesta inmunológica puede haber sido escaso.

De esta manera, la ausencia de alguno de los síntomas clínicos descritos por Griffith *y col.* (2006) y Brown *y col.* (2007) compatibles con cuadros clínicos de salmonelosis, sumado a los resultados obtenidos por serología y bacteriología de CC y

GMI de la progenie, y a la detección del mismo subtipo genético en cerdos de diferentes semanas, podemos inferir que la progenie de la granja estaría infectada por *S. Derby*, con una presentación subclínica de la enfermedad.

Comparación Genética

De acuerdo con Tenovar *y col.* (1995), dos aislamientos bacterianos que difieren por un *evento genético* simple, reflejado en el perfil electroforético obtenido por PFGE con una diferencia de 2-3 bandas, son clasificadas como “estrechamente relacionadas”. Asimismo, aislamientos con dos diferencias genéticas, representado por 4-6 bandas distintas, son “posiblemente relacionadas”; mientras que aislamientos con tres o más diferencias genéticas (más de siete bandas distintas) son consideradas “diferentes o no relacionadas”. Al aplicar esta clasificación, podría decirse que los aislamientos de *S. Typhimurium* de GMI del GRUPO4 y de MF del GRUPO7, que difirieron en cinco bandas, estarían relacionados, sobre todo si se tiene en cuenta la poca clonalidad de esta serovariedad (Foley *y col.*, 2009). No obstante, según el mismo Foley *y col.* (2009) este sistema de clasificación es poco preciso, y por lo tanto, se deberían considerar como aislamientos no relacionados. Mayores precisiones podrían obtenerse con la utilización de otras enzimas de restricción, o de técnicas con mayor poder de discriminación que el PFGE, como el *Multilocusvariable-number of tandem-repeats analysis* (MLVA) utilizada por Bergamini *y col.* (2011).

Considerando lo anterior, podemos inferir que la subtipificación de los aislamientos de *Salmonella enterica* por PFGE permitió identificar la presencia de distintos subtipos genéticos de *S. Typhimurium* en la MF de las cachorras en granja y en los GMI de las cachorras descartadas, sugiriendo que diversas fuentes de infección involucradas en la introducción de este patógeno en la granja, o tal cual lo planteado por

Magistrali y col.(2008) y Mannion y col. (2012), a la posible infección/contaminación con nuevas serovariedades de *Salmonella enterica* durante el transporte o estadía previa a la faena. El aislamiento de un mismo subtipo genético de *S. Schwarzengrund* en MF y GMI del GRUPO 7 y 9, puede indicar el ingreso de este subtipo a la granja a partir del séptimo GRUPO y su posible diseminación a los posteriores, lo que concuerda con los porcentajes de animales seropositivos al 40%DO en esos grupos; o bien la posible exposición de las cachorras a una misma fuente de infección.

Por otra parte, el PFGE realizado a las cepas de *S. Derby* recuperadas de muestras de la progenie evidenció el mismo subtipo genético dentro de esta subpoblación, aunque el perfil genético fue distinto a las cepas de la misma serovariedad aisladas en GMI de cachorras del GRUPO 4 y 5, que a su vez presentaron perfiles de PFGE diferentes entre sí. De esta forma, se puede decir que las cepas de *S. Derby* aisladas de la progenie no estaban relacionadas con las correspondientes a los aislamientos de las cachorras en frigorífico. Como esta fue la única serovariedad encontrada en la progenie, podemos concluir que no se encontraron evidencias de subtipos genéticos compartidos entre ambas subpoblaciones (cachorras/progenie).

Transmisión de Salmonella de la Cachorra a su Progenie

Según los resultados obtenidos en el monitoreo de las cachorras y en el monitoreo de su progenie al segundo parto para determinar la prevalencia de infección de cada uno, podemos ver que la situación con respecto a la infección por *Salmonella enterica* fue diferente para cada grupo. Es así que las serovariedades *S. Typhimurium* y principalmente *S. Schwarzengrund* serían responsables de las infecciones en las cachorras, mientras que *S. Derby* sería la responsable de las infecciones en la progenie.

La falta de inmunidad cruzada entre serotipos de *Salmonella enterica*, podría estar relacionado a la protección de los lechones sólo hacia la serovariedad circulante en las madres mediante la inmunidad pasiva adquirida durante la lactancia. Esto fue demostrado por Hur & Lee (2010) en un trabajo donde evaluaron el uso de una vacuna viva atenuada de *S. Typhimurium* en cerdas para proteger a su progenie. Los autores reportaron que los niveles séricos de IgG e IgA fueron significativamente mayores tanto en las hembras vacunadas como en sus crías, con respecto a un grupo control no vacunado. Si bien, tanto la IgG como la IgA presentes en grandes concentraciones en el calostro, solo son absorbidas por el lechón durante las primeras horas de vida, la IgA sigue estando presente en la leche materna, y como es sabido, la principal acción de esta inmunoglobulina es la de impedir la adherencia de bacterias a la superficies epiteliales y por lo tanto que continúen su tránsito por el intestino (Tizar, 2009). De esta manera podemos pensar que esto disminuiría la probabilidad de que los animales se infecten directamente con las serovariedades que infectaron a la madre.

Esto coincide con el efecto protector de la madre a su progenie propuesto por Kranker y col. (2003) aunque contrasta con lo planteado por Lurette y col. (2009) sobre que la infección que ocurre entre el nacimiento y el destete sería el punto crítico en la diseminación de *Salmonella enterica* dentro de una granja porcina, pero cabe señalar que en ese trabajo los autores se basaron en modelos matemáticos que evaluaban los resultados de estudios previos.

Así entonces, los lechones estarían protegidos a la infección por la inmunidad pasiva, sin embargo, los cerdos serían susceptibles a la infección por otra serovariedad presente en la granja y de circulación en los animales de producción. Es por esto que el uso del destete precoz segregado como una medida de manejo eficaz para el control de

salmonelosis en granjas porcinas propuesto por Nietfeld *y col.*(1998) no parece ser una medida tan efectiva, sino que sería contraproducente debido a que se expondría a los animales a nuevos ambientes y nuevas serovariedades, sumado a lo propuesto por Kranker *y col.* (2003) sobre el estrés posdestete que predispondría a esos animales a nuevas infecciones. Además de esto, los resultados de la determinación de la prevalencia de infección de las cachorras en este estudio demostraron que, a pesar que las cachorras utilizadas para poblar la granja fueron destetadas con menos de 9 días de vida y llevadas a una granja nueva, la metodología implementada permitió detectar cachorras infectadas por *Salmonella enterica*.

También es cierto que, según lo reportado por estudios anteriores (Nielsen *y col.*,1995; Kranker *y col.*, 2003),la falta de respuesta inmunológica detectable en animales infectados naturalmente por *Salmonella enterica* podría constituir un riesgo para la progenie de estas cerdas, ya que no podrían lograr una inmunidad pasiva protectora en sus crías. Esto puede verse en los resultados serológicos de la progenie en este trabajo, donde sólo uno de cada cinco lechones tenía niveles de anticuerpos suficientes para clasificarse como positivo al punto de corte mas bajo (10%DO).

Particularmente en este trabajo, los cerdos en producción comenzaron a detectarse como positivos a *Salmonella spp.*, por serología y bacteriología, recién en el sitio de engorde, a pesar de haber pasado por otro sitio previamente. En otras palabras, los cerdos comenzaron a detectarse como seropositivos 100 días después de haber sido alejados de su madre. Si bien la serovariedad propuesta como de mayor frecuencia de presentación en las cachorras no es de las consideradas como de alta virulencia, parece poco probable que la respuesta inmunológica se produzca tanto tiempo después.

Un resultado similar fue reportado por Silva *y col.* (2006) en un trabajo llevado a

cabo en un sistema productivo con aislamientos anteriores de *Salmonella* spp. donde evaluaron las fases en las que ocurría la infección y la seroconversión. Aunque los autores encontraron un 32% de cerdas que arrojaban *Salmonella* spp. en MF, coincidiendo todas con cachorras de reposición, y lograron recuperar *S. Typhimurium* tanto en las heces de las madres en maternidad como en las heces de los cerdos en terminación, los resultados que obtuvieron por serología concluyeron que la presencia de hembras seropositivas y que arrojaban *Salmonella* spp. en heces no determinó la infección de sus lechones, sino que los mismos se habrían infectado durante la fase de terminación.

Según Nolle et al. (2005b) en un trabajo con 106 cerdas de tres granjas de ciclo completo de Bélgica, donde realizaron un seguimiento de las cerdas durante cuatro etapas del ciclo productivo definidas como (i) Gestación tardía (-37 y -7 días del parto, en galpón de gestación), (ii) Maternidad (-2, 4 y 7 días del parto, en sala de maternidad), (iii) Destete (25 y 34 días del parto, en galpón de servicio) y (iv) Gestación (64 días del parto, en galpón de gestación). En ese trabajo, el seguimiento se basó en la detección de *Salmonella* spp. en muestras de sangre, heces, hisopado ambiental (en cada sitio luego del ingreso de los animales) y alimento, en esas cuatro etapas del ciclo. Los autores no registraron aislamientos de *Salmonella* en ninguna de las muestras de alimento, ni en los hisopados de las maternidades, pero sí encontraron que entre el 15% y el 59% de cerdas fue positiva a *Salmonella* spp. al menos una vez en las tres granjas. Además, reportaron que durante la gestación tardía, alrededor del parto y durante la lactación, la prevalencia de eliminadoras de *Salmonella enterica* fue menor al 10% en todas las granjas, por lo que a pesar de los cambios hormonales e inmunológicos que implicaría, no encontraron cambios periparturientos en los patrones de eliminación. Sin embargo, sí se evidenciaron

incremento en el número de eliminadoras siete días posteriores al destete en dos de las tres granjas, a pesar que sólo aislaron *Salmonella enterica* en el ambiente de un galpón de servicio, y de que ésta era de un serotipo diferente al aislado en cerdas. Según sus resultados, los autores concluyeron en destacar el importante rol de las cerdas en el mantenimiento de la infección de *Salmonella* en una granja de ciclo completo, considerando que el estrés y las condiciones de alojamiento favorecen a infecciones pos destete, lo que incrementa el número de eliminadoras y la circulación de *Salmonella* en el plantel reproductivo.

Teniendo en cuenta los resultados de Nollet *y col.* (2005b), y de acuerdo con los resultados de este trabajo, podemos inferir que las infecciones por *Salmonella enterica* en una granja de ciclo completo con sitios múltiples se comportarían en forma diferencial entre el plantel reproductor y los animales en crecimiento y engorde, donde cada subpoblación albergaría una cepa particular de *Salmonella* que circularía entre sus individuos. En este sentido, la introducción de nuevos animales a cada subpoblación, ya sean cachorras de reposición o lechones destetados, sumaría animales susceptibles a la infección, y por lo tanto, favorecería el mantenimiento de la bacteria en la piara. Esto coincide con lo planteado por Silva *y col.* (2006), en que las cachorras introducirían nuevos serotipos de *Salmonella enterica* en la población, aunque debería aplicarse particularmente a los reproductores.

En el caso específico de las cachorras de reposición se debe tener en cuenta el trabajo realizado por Davies *y col.* (2000) donde estudiaron los patrones de eliminación de *Salmonella* por dos cohortes de cachorras de reposición antes y después de introducirlas a una granja de 1200 madres. Brevemente, los autores tomaron muestras de heces de las cachorras en la granja de origen tres días antes de su salida, y en el corral

del galpón de gestación de la granja de destino, 11 días después de su introducción a la granja. Una segunda cohorte fue llevada un mes después, alojando la mayoría de las cachorras en los corrales de cuarentena y otras fueron llevadas directamente a las jaulas del galpón de gestación, donde se les tomó muestras de heces a los cuatro y 11 días posteriores a su arribo.

Según sus resultados, *S. Typhimurium* var. Copenhagen fue la serovariedad predominante en la granja de origen en las dos cohortes, con el 3,3% y 3,7% de las cachorras positivas para la corte uno y dos respectivamente. Luego, en las muestras tomadas a las cachorras en la granja de destino, 11 días posterior a su arribo, los autores reportaron el aislamiento de *Salmonella enterica* en el 47% y 46% de las cachorras para la cohorte uno y dos respectivamente. Además, *S. Typhimurium* var. Copenhagen representó el 53% de los aislamientos de la cohorte uno en la granja de destino, aunque, esa serovariedad no fue encontrada en la cohorte dos, donde *S. Heidelberg* representó el 89% de los aislamientos. Finalmente los autores destacan que el movimiento de animales entre granjas representa un factor muy importante en la epidemiología de *Salmonella enterica*, ya sea por la activación de infecciones latentes o por la adquisición de nuevas infecciones. Cabe destacar que las infecciones a las que se refieren los autores se darían en el sitio uno entre las dos subpoblaciones expuestas como son las cachorras de reposición que ingresan y los reproductores de la granja, siempre y cuando las cachorras se lleven directamente allí.

En ese sentido, Rao y col. (2010) estudiaron la transmisión de *Salmonella* spp. en el sitio uno, donde a partir del uso de métodos estadísticos para el análisis de distancias genéticas calculadas por REP-PCR y espaciales de aislamientos de hisopados ambientales, los autores encontraron diferencias entre los aislamientos según el

momento y lugar de muestreo dentro del mismo sitio. En definitiva, plantean que *Salmonella* spp. posee una distribución en grupos de cerdos, que a su vez poseen una cierta distribución espacial dentro de los galpones, donde la transmisión se da en periodos cortos de tiempo y generalmente limitada a corrales vecinos. Esto coincide y profundiza la idea de circulación del patógeno dentro de subpoblaciones planteada en este trabajo.

Por otra parte, la introducción de nuevas serovariedades de *Salmonella enterica* a partir de las diversas fuentes de infección planteadas por Barber *y col.* (2002), Weigel *y col.*(2007) y Cardinale *y col.*(2010), como son el personal de la granja, el alimento, la presencia de insectos o las heces de aves y roedores, podría desestabilizar el ciclo en cualquiera de las subpoblaciones, o en ambas, y es donde se producirían los brotes clínicos de la enfermedad. Esto último quedó evidenciado en este trabajo luego del aislamiento de *S. Typhimurium* de un brote clínico en cerdos de recría un año después del monitoreo de la progenie, y teniendo en cuenta que la cepa aislada no presentó ninguna homología genética con las cepas de la misma serovariedad aisladas anteriormente en la granja (GMI y MF de las cachorras), podemos inferir que fue introducida en la recría previo a producirse el brote.

La diferencia de serotipos predominantes entre las madres y sus progenie en este trabajo coincide con lo encontrado por Funk *y col.* (2001), sumado a la identificación de subtipos genéticos diferentes entre los dos aislamientos de *S. Derby* de las cachorras y dos aislamientos de la progenie, respalda la hipótesis de la posible exposición de los lechones a la infección por cepas distintas de *Salmonella enterica*, mas que a la posible evolución genética de la población de *Salmonella*, que como plantea Rao *y col.* (2010), sería lenta en el tiempo.

Por otro lado, contrasta con lo encontrado por Vigo *y col.* (2009) en una granja de sitios múltiples con cuadros subclínicos de salmonelosis en Argentina, donde a partir de muestras de suero y MF de las madres en sitio uno y de los cerdos a los 21, 35, 65, 86, 128 y 165 días de vida, analizaron los patrones de eliminación y los tiempos de respuesta serológica en los animales. Los autores reportaron que los porcentajes de muestras de MF positivas a *Salmonella* spp. se incrementaron desde alrededor del 18% en la maternidad, a alrededor del 90% en el sitio dos (35 días de vida), luego cayó al 10% en el sitio tres (65 días de vida) y por último hizo un nuevo pico de aproximadamente 50% a los 86 días de vida, luego delo cual no volvió a aislarse. Las serovariedades encontradas fueron *S. Bovismorbificans*, con tres patrones genéticos diferentes determinados por PFGE, y *S. Muenster* con dos patrones genéticos diferentes. A pesar de que los autores reportaron haber aislado las mismas serovariedades de las madres, los lechones y en diferentes edades de cerdos en engorde, es necesario destacar que trabajaron con muestras de pooles de materia fecal tomadas del suelo, lo que favorecería el aislamiento de serovariedades de *Salmonella enterica* de las denominadas “ambientales”, y que concuerdan con las serovariedades aisladas. Además, sólo la cepa de *S. Muenster* aislada del corral de las madres y la cepa aislada en el corral de los lechones presentó un perfil genético indistinguible al *XbaI*-PFGE, aunque ambas cepas presentaron perfiles de resistencia a antibióticos diferentes. Esto podría indicar que si bien se trataría de diferentes cepas, al trabajar con una sola enzima de restricción, al igual que en este trabajo, el menor poder discriminatorio del PFGE con respecto a otras técnicas de subtipificación molecular propuesto por Foley *y col.* en 2009 no permitió diferenciarlas.

El uso de estas técnicas moleculares para la detección de subtipos de *Salmonella enterica* fue puesta en manifiesto también por Penmetchsa y col. (2009) en un estudio donde evaluaron si las cachorras de reemplazo de origen externo introducirían nuevos genotipos de *Salmonella* en una granja y si adquiriría la infección de los cerdos residentes, donde no encontraron evidencias de patrones genéticos de *Salmonella* introducidos por las cachorras. Los autores realizaron un seguimiento de las cachorras, a partir de muestras de 1gr de materia fecal e hisopados del piso de los corrales, durante su arribo a la granja, siete días después y periódicamente durante su paso por los galpones de engorde hasta llegar al peso suficiente para ser finalmente llevadas al sitio de servicio-gestación. Siguiendo esta metodología, sólo fueron capaces de aislar *Salmonella* en la materia fecal de cachorras a las 22 semanas de vida, con perfiles genéticos que pertenecerían a los normalmente encontrados en la granja. En definitiva, proponen que el riesgo de introducir nuevos genotipos de *Salmonella* a partir del ingreso de cachorras de reposición es muy bajo. No obstante, los autores reportaron que tres aislamientos de *S. Anatum* de las cachorras y cinco de las cerdas en el sitio de servicio-gestación presentaron el mismo subtipo genético, aunque no pudieron determinar cuál fue la dirección de la transmisión.

CONCLUSION

CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos, se puede concluir que en una granja múltiple sitio con infecciones subclínicas por *Salmonella*, los subtipos genéticos de *Salmonella enterica* que circulan en los reproductores, son diferentes a los subtipos de su progenie. Esto indicaría que las progenies no se infectarían con *Salmonella enterica* en forma directa desde sus madres durante la lactancia, sino más bien, de cualquiera de las posibles fuentes de infección presentes en los sitios de engorde.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anonymous. Erratum. In Annual report of zoonoses in Denmark 2004. Ministry of Family and Consumer Affairs, Copenhagen, (2005) 11-12.

Anonymous. European Food Safety Authority (EFSA). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. *The EFSA Journal* 310 (10) (2006a): 23-95.

Anonymous. Decisión de la Comisión del 29 de septiembre de 2006 relativa a una ayuda financiera de la Comunidad para un estudio de referencia sobre la prevalencia de *Salmonella* en cerdos de abasto que se llevará a cabo en los Estados Miembros. *Diario Oficial de la Unión Europea*(2006b). L275 / 51-61.

Anonymous. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A, *The EFSA Journal* 135 (2008a): 1-111.

Anonymous. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part B, *The EFSA Journal* 206 (2008b): 1-111.

Anonymous. European Food Safety Authority (EFSA). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* 1496 (2010): 1-288.

Aarestrup F.M.; R.S. Hendriksen; J. Lockett; K. Gay; K. Teates; P.F. McDermott; D.G. White; H. Hasman; G. Sørensen; A. Bangtrakulnonth; S. Pornreongwong; C. Pulsrikarn; F.J. Angulo; P. Gerner-Smidt. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. *Emerg. Infect. Dis.* Vol.13, No.5, (2007): 726-731.

Adley, C.; C. Dillon; C.P. Morris; N. Delappe; M. Cormican. Prevalence of *Salmonella* in pig ear pet treats. *Food Res. Int.*44 (2011): 193–197.

Alban, L.; H. Stege & J. Dahl. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev.Vet.Med.*53 (2002): 133-146.

Alban, L.; F.M. Baptista; V. Møgelmoose; L.L. Sørensen; H. Christensen; S. Aabo; J. Dahl. *Salmonella* surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark — A case study. *Food Research International* 45 (2012): 656–665.

Alsop, J.E. An outbreak of salmonellosis in a swine finishing barn. *J. Swine Health and Prod.*13(5) (2005): 265-268.

Arnold, M.E. & A.J.C. Cook. Estimation of sample sizes for pooled faecal sampling for detection of *Salmonella* in pig. *Epidemiol. Infect.* (2009): 1-8.

Arnold, M.E.; J.J. Carrique-Mas; I. McLaren; R.H. Davies. A comparison of pooled and individual bird sampling for detection of *Salmonella* in commercial egg laying flocks. *Prev.Vet.Med.* 99 (2011): 176–184.

Aury, K.; M. Chemaly; I. Petetin; S. Rouxel; M. Picherot; V. Michel; S. Le Bouquin. Prevalence and risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French breeding and fattening turkey flocks at the end of the rearing period. *Prev.Vet.Med.*94 (2010): 84–93.

Bahnson P.B.; D.J. Damman; R.E. Isaacson; G.Y. Millar; R.M. Weigel; H.F. Troutt. Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* isolated from ileocolic lymph nodes of market pigs reared in selected Midwest US swine herds. *J Swine Health Prod.* 14(4) (2006b): 182–188.

Baptista, F.M.; L. Alban; A.K. Ersbøll; L.R. Nielsen. Factors affecting persistence of high Salmonella serology in Danish pig herds. *Prev.Vet.Med.* 92 (2009): 301–308.

Barber D.A.; P.B. Bahnson; R. Isaacson; C.J. Jones; R.M. Weigel. Distribution of Salmonella in swine production ecosystems. *J Food Prot.* 65(12) (2002): 1861-1868.

Baum, D.H.; S. Ward; C.L. Baum; N. Lee; D.D. Polson; D.L. Harris; B. Nielsen. Statistical process control methods used to evaluate the serologic responses of pigs infected with three *Salmonella* serovars. *J Swine Health Prod.* 13(6) (2005): 304-313.

Bearson, B.L. & S.M.D. Bearson. Host specific differences alter the requirement for certain Salmonella genes during swine colonization. *Vet.Microb.* 150 (2011): 215–219.

Ben-Darif, E.; E. De Pinna; E.J. Threlfall; F.J. Bolton; M. Upton; A.J. Fox. Comparison of a semi-automated rep-PCR system and multilocus sequence typing for differentiation of *Salmonella enterica* isolates. *J. of Microbiological Methods* 81 (2010): 11–16.

Benschop, J.; M.A. Stevenson; J. Dahl; N.P. French. Towards incorporating spatial risk analysis for Salmonella sero-positivity into the Danish swine surveillance programme. *Prev.Vet.Med.* 83 (2008): 347–359.

Bergamini, F.; A. Iori; P. Massi; S. Pongolini. Multilocus variable-number of tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum and comparison with pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *Vet.Microb.* 149 (2011): 430–436.

Boyen, F.; F. Haesebrouck; A. Vanparys; J. Volf; M. Mahu; F. Van Immerseel; I. Rychlik; J. Dewulf; R. Ducatelle; F. Pasmans. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet.Microb.* 132 (2008): 319–327.

Brown, C.C.; D.C. Baker & I.K. Barker. *Alimentary system*. En: *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 5th edition. M. Grant Maxie (ed). Elsevier Saunders Lt. Vol.2 (2007): 193-199.

Caffer, M.I.; A. Alcain; M. Panagopulo; R. Terragno. Evolución de la Salmonelosis en Argentina, en el período 2004-2006. Comunicación oral 7. XI Congreso Argentino de Microbiología, Córdoba. Argentina. Libro de Resúmenes (2007): 22.

Caffer, M.I.; R. Terragno & N. Binsztein. Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del *WHO Global Salm Surv* para América del Sur.(2008):1-76.

Cardinale, E.; S. Maeder; V. Porphyre; M. Debin. *Salmonella* in fattening pigs in Reunion Island: Herd prevalence and risk factors for infection. *Prev.Vet.Med.*96 (2010): 281-285.

Carlson, A.R. & T. Blaha. In-herd prevalence of Salmonella in 25 selected Minnesota swine farms. *J. Swine Health Prod.* 9(1) (2001): 7-10.

Chiu, C.H.; L.H. Su & C. Chu. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin.Microb. Reviews* Vol. 17(2) (2004): 311-322.

Clough, H.E.; S.E. Fenton; N.P. French; A.J. Miller; A.J.C. Cook. Evidence from the UK Zoonoses Action Plan in favour of localized anomalies of Salmonella infection on United Kingdom pig farms. *Prev.Vet.Med.* 89 (2009): 67-74.

Côté, S.; A. Letellier; L. Lessard; S. Quessy. Distribution of Salmonella in tissues following natural and experimental infection in pigs. *The Can. J. of Vet.Res.* 68 (2004): 241-248.

Dahshan, H.; F. Shahada; T. Chuma; H. Moriki; K. Okamoto. Genetic analysis of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Stanley and Typhimurium from cattle. *Vet. Microb.* 145 (2010): 76–83.

Davies, P. Fecal shedding of *Salmonella* by pigs housed in buildings with open-flush gutters. *Swine Health and Prod.* 6(3) (1998): 101–106.

Davies, P.; J. Funk & W.E.M. Morrow. Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Swine Health and Prod.* 7(5) (1999): 231-243.

Davies, P.R.; J.A. Funk & W.E.M. Morrow. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *J Swine Health Prod.* 8(1) (2000): 25-29.

Davies, R.H.; R. Dalziel; J.C. Gibbens; J.W. Wilesmith; J.M. Ryan; S.J. Evans; C. Byrne; G.A. Paiba; S.J. Pascone; C.J. Teale. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *J. Applied Microb.* 96 (2004): 750-760.

De Busser, E.V.; D. Maes; K. Houf; J. Dewulf; H. Imberechts; S. Bertrand; L. De Zutter. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int. J. of Food Microb.* 145 (2011): 279–286.

de Vos, C.J.; H.W. Saatkamp & J. Ehlers. Simulation evaluation of *Salmonella* monitoring in finishing pigs in Lower Saxony, Germany. *Prev. Vet. Med.* 82 (2007): 123-137.

Erdman, M.M.; S.D. Wedel & D.L. Harris. Genotypic and phenotypic comparison of swine *Salmonella* isolates from farm and abattoir. *J Swine Health Prod.* 11(4) (2003): 169-172.

Eriksson, E. & A. Aspan. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet.Res.*(2007): 3-21.

Farzan, A.; R.M. Friendship; C.E. Dewey; K. Warriner; C. Poppe; K. Klotins. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Prev.Vet.Med.* 73 (2006): 241–254.

Foley, S.L.; A.M. Lynne; R. Nayak. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Inf, Genetics and Evolution* 9 (2009); 430–440.

Frenzen, P.D.; T.L. Riggs; J.C. Buzby; T. Breuer; T. Roberts; D. Voetsch; S. Reddy. FoodNet Working Group. *Salmonella* cost estimate updated using FoodNet data. *FoodReview* 22 (1999): 10–15.

Funk, J.A.; P.R. Davies & M.A. Nichols. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J. Vet. Diag. Invest.* 12 (2000): 412–418.

Funk, J.A.; P.R. Davies & M.A. Nichols. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet.Microb.* 83 (2001): 45-60.

Funk, J. Pre-harvest food safety diagnostics for *Salmonella* serovars. Part 1: Microbiological culture. *J. Swine Health Prod.* 11 (2) (2003): 87-90.

García del Portillo, F.; C. Núñez-Hernández; B. Eisman; J. Ramos-Vivas. Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Current Opinion in Microb.*11 (2008): 46–52.

García-Feliz, C.; A .Carvajal; J.A. Collazos; P. Rubio. Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Prev.Vet.Med.* 91 (2009): 130–136.

Ghosh, A.C. An epidemiological study of the incidence of Salmonellas in pigs. *J. Hyg. Camb.* 70 (1972): 151–160.

Gooch, J.M. & R.L. Haddock. Swine salmonellosis in a Hawaiian piggery. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 154 (1969): 1051-1054.

Gormley, F.J.; C.L. Little; K.A. Grant; E. de Pinna; J. McLauchlin. The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and specialty food shops: A UK wide study with a focus on *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microb.* 27 (2010): 243-249.

Guenther, S.; M. Filter; K. Tedin; I. Szab; L.H. Wieler; K. Nöckler; N. Walk; P. Schierack. Enterobacteriaceae populations during experimental *Salmonella* infection in pigs. *Vet.Microb.* 142 (2010): 352–360.

Gray, J.T.; P.J. Fedorka-Gray & T.S. Stabel. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella Choleraesuis* in swine. *Vet.Microb.* 47 (1995): 43-49.

Griffith, R.W.; K.J. Schwartz & D.K. Meyerholz. *Samonella*. En: *Diseases of Swine*, 9th edition. Straw, B.E.; J.J. Zimmerman; S. D’Allaire; D.J. Taylor (eds.) Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd. (2006): 739-754.

Gutzmann, F.; H. Layton; K. Simiins; H. Jarolmen. Influence of antibiotic-supplemented feed on the occurrence and persistence of *Salmonella Typhimurium* in experimentally infected swine. *American J. Vet.Res.* 37 (1976): 649-655.

Harris, I.T. Serologic basis for assessment of subclinical *Salmonella* infection in swine: Part 1. *J. Swine Health Prod.* 11(5) (2003a): 247-251.

Harris, I.T. Serologic basis for assessment of subclinical *Salmonella* infection in swine: Part 2. *J. Swine Health Prod.* 11(6) (2003b): 300-303.

Hautekiet, V.; V. Geert; V. Marc; G. Rony. Development of a sanitary risk index for *Salmonella* seroprevalence in Belgian pig farms. *Prev. Vet. Med.* 86 (2008): 75–92.

Hur, J. & J.H. Lee. Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. *Vet. Microb.* 143 (2010): 270–276.

Hurd, H.S.; J.K. Gailey; J.D. McKean; M.H. Rostagno. Rapid infection in market-weight following exposure to a *Salmonella typhimurium*-contaminated environment. *A. J. of Vet. Res.* 62 (2001): 1194–1197.

Ibar, M.P.; G. Vigo; P. Piñeyro, M.I. Caffer, P. Quiroga, C. Perfumo, D. Centrón, G. Giacoboni. Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. *Rev. Argentina de Microb.* 41 (2009): 156-162.

Jensen, A.; A. Dalsgaard; A. Stockmarr; E. Møller Nielsen; D. L. Baggesen. Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. *Appl. and Env. Microb.* Vol. 72, No. 3 (2006): 1833–1842.

Kérouanton, A.; M. Marault; R.Lailler; F.X.Weill; C. Feurer; E. Espié; A. Brisabois. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *Foodborne Pathog. Dis.* 4 (3) (2007): 293-303.

Kranker, S.; L. Alban; J. Boes; J. Dahl. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J. of Clin. Microb.* Vol. 41, No. 6 (2003): 2282–2288.

Lahiri, A.; A. Lahiri; N. Iyer; P. Das; D. Chakravorty. Visiting the cell biology of Salmonella infection. Review. *Microbes and Infection* 12 (2010): 809-818.

Lakshmaiah, V.; M.S. Arun; A. Malini; S.R. Prasad. Polyserositis due to Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (2009), doi:10.1016/j.trstmh.2009.01.024.

Lawson, L.G.; J.D. Jensen; P. Christiansen; M. Lund. Cost-effectiveness of Salmonella reduction in Danish abattoirs. *Int. J. of Food Microb.* 134 (2009): 126–132.

Litrup, E.; M. Torpdahl; B. Malorny; S.H.H. Christensen; E.M. Nielsen. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of Salmonella enterica. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2010): 1132–1139.

Loynachan, A.T. & D.L. Hank Harris. Minimum infectious dose determination for acute infection of *Salmonella* in swine. *American Association Of Swine Veterinarians* (2004): 415-418.

Loynachan, A.T. & D.L. Harris. Dose determination for acute Salmonella infection in pigs. *Appl and Env. Microb.* 71(5) (2005): 2753–2755.

Lurette, A.; C. Belloc; S. Touzeau; T. Hoch; P. Ezanno; H. Seegers; C. Fourichon. Modelling *Salmonella* spread within a farrow-to-finish pig herd. *Vet. Res.* (2008): 39-49.

Lurette, A.; S. Touzeau; M. Lamboni; H. Monod. Sensitivity analysis to identify key parameters influencing Salmonella infection dynamics in a pig batch. *J. of Theo. Biology* 258 (2009): 43-52.

Magistrali, A.; A.M. Dionisi; P. De Curtis; L. Cucco; O. Vischi; S. Scuota; A. Zicavo; G. Pezzotti. Contamination of Salmonella spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Res. in Vet. Science* 85 (2008): 204–207.

Malorny, B.; J. Hoorfar; C. Bunge; R. Helmuth. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an International Standard. *Appl. and Env. Microb.* 69(1) (2003a): 290–296.

Malorny, B.; J. Hoorfar; M. Hugas; A. Heuvelink; P. Fach; L. Ellerbrock; C. Bunge; C. Dorn; R. Helmut. Interlaboratory diagnostic accuracy of a Salmonella specific PCR based method. *Int. J. Food Microbiol.* 89 (2003b): 241–249.

Mannion, C.; J. Fanning; J. McLernon; L. Lendrum; M. Gutierrez; S. Duggan; J. Egan. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. *Food Res. Int.* 45 (2012): 871–879.

McDowell, S.W.J.; R. Porter; R. Madden; B. Cooper; S.D. Neill. Salmonella in slaughter pigs in Northern Ireland: Prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects. *Int. J. of Food Microb.* 118 (2007): 116–125.

McKean, J.D. & O'Connor, A.M. Describing the *Salmonella* classification levels for low-volume production systems utilizing abattoir-based samples and classification stability over time. *J. Swine Health Prod.* 17(4) (2009): 198–203.

Merle, R.; S. Kösters; T. May; U. Portschi; T. Blaha; L. Kreienbrock. Serological Salmonella monitoring in German pig herds: Results of the years 2003–2008. *Prev. Vet. Med.* 99 (2011): 229–233.

Miller, G.; X. Liu; P. McNamara; D. Barber. Influence of *Salmonella* in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J Food Protect.* 68 (2005): 1788–1798.

Møgelmoose, V.; B. Nielsen; J. Bagger; K. Pihl; V. Nielsen. Eradication of multi-resistant *Salmonella typhimurium* dt104 infections in danish swine herds. *The 16th International Pig Vet. Society Congress*, Melbourne, Australia, 2000: 216.

Morrow, W.E.M.; P.R. Davies; T. See; J. Eisemann; K. Zering; S. Kihlstrom; K. Karli. Prevalence of *Salmonella* spp. In the feces on farm and ceca at slaughter for a cohort of finishing pigs. Proceeding of the 3th Int. Symp. Epidem. Control *Salmonella* in Pork. Washington DC. 1999.

Muirhead, M.R. & T.J.L. Alexander. *Comprendiendo la enfermedad.* En: Manejo sanitario y tratamiento de las enfermedades del cerdo (1ra edición). T.J.L. Alexander (ed.). Editorial Intermédica, Buenos Aires (2001): 57-62.

Mullis, K.; F. Faloona; S. Scharf; R. Saiki; G. Horn; H. Erlich. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LI(1986): 263-273.

Myint, M.S.; Y.J. Johnsona; N.L. Tablantea; R.A. Heckert. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microb.* 23 (2006): 599–604.

Nath, G.; P. Maurya & A.K. Gulati. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2010): 530–536.

Nielsen, B.; D. Baggesen; F. Bager; J. Haugegaard; P. Lind. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet.Microb.* 47 (1995): 205-218.

Nielsen, J.P.; M. Andreasen & B. Carstensen. *Salmonella* herd profiles established by serological testing. *Proceeding of the Second International Symposium on*

Epidemiology and Control of Salmonella in Pork. Copenhagen. Denmark, August 20-22, 1997: 110-113.

Nietfeld, J.C.; I. Feder; T.T. Kramer; D. Schoneweis; M.M. Chengappa. Preventing Salmonella infection in pigs with offsite weaning. *Swine Health and Prod.* 6(1) (1998): 27-32.

Nollet, N.; D. Maes; L. Duchateau; V. Hautekiet; K. Houf; J. van Hoof; L. de Zutter; A. de Kruif; R. Geers. Discrepancies between the isolation of Salmonella from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet.Res.* 36 (2005a): 545–555.

Nollet, N.; K. Houf; J. Dewulf; A. de Kruif; L. de Zutter; D. Maes. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet.Res.* 36 (2005b): 645-656.

Nowak, B.; T. von Müffling; S. Chaunchom; J. Hartung. Salmonella contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. *Int. J. of Food Microb.* 115 (2007): 259–267.

Olive, D. & P. Bean. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin.Microb.* 37 (1999): 1661-1669.

Oliveira, C.J.B.; T.B. Garcia; L.F.O.S. Carvalho; P.E.N. Givisiez. Nose-to-nose transmission of Salmonella Typhimurium between weaned pigs. *Vet.Microb.* 125 (2007): 355–361.

Oliveira, L.G.; L.F.O.S. Carvalho; G.C.I.H. Masson; M.A.R. Feliciano. Infecção experimental por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo Panama e tentativa de transmissão nasonasal em leitões desmamados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(6) (2010): 1340-1347.

Penmetchsa, T.V.; B.A. White; C.W. Maddox; L.D. Firkins; R.M. Weigel. Molecular epidemiologic investigation of the role of gilts in the introduction and transmission of *Salmonella* in swine production systems. *J Swine Health Prod.* 17(2) (2009): 81–89.

Plym Forshell, L. & M. Wierup. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. sci. tech. Off. International Epiz.* 25(2) (2006): 541-554.

Prendergast, D.M.; S.J. Duggan; U. Gonzales-Barron; S. Fanning; F. Butler; M. Cormican; G. Duffy. Prevalence, numbers and characteristics of *Salmonella* spp. on Irish retail pork. *Int. J. of Food Microb.* 131 (2009): 233–239.

Proux, K.; C. Houdayer; F. Humbert; R. Cariolet; V. Rose; E. Eveno; F. Madec. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Vet.Res.*31 (2000): 481-490.

Ramos Moreno, A.C.; A. Fernandes Filhoa; T. do Amaral Tardelli Gomesb; S.T.S. Ramosc; L.P.G. Montemora; V.C. Tavaresa; L. dos Santos Filhod; K. Irinoe; M. Baquerizo Martineza. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diag Microb and Infect Disease.* In Press, Corrected Proof. Available at:<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T60-4SM20771/2/679ef0507f128771b3e535a97d7b693b>.

Rao, S.; U. Kitron; R.M. Weigel. Spatial and genotypic clustering of *Salmonella* over time in a swine production unit. *Prev.Vet.Med.* 97 (2010): 90-99.

Ribot, E.M., M.A. Fair, R. Gautom, D.N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, T. J. Barrett. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the

subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 3 (1) (2006): 59-67.

Rostagno, M.H.; H.S. Hurd; J.D. McKean. Variation of bacteriologic and serologic *Salmonella enterica* prevalence between cohorts within finishing swine production farms. *Food Research International* 45 (2012): 867–870.

Salmon, D.E. & T. Smith. The bacterium of swine plague. *A. Mongr. Microb. J.* 7 (1886): 204.

Sandt, C.H.; D.A. Krouse; C.R. Cook; A.L. Hackman; W.A. Chmielecki ; N.G. Warren. The key role of pulsed-field gel electrophoresis in investigation of a large multiserotype and multistate food-borne outbreak of *Salmonella* infections centered in Pennsylvania. *J. Clin. Microb.* 44 (9) (2006): 3208-12.

Schulze, T.; A. Ludtke; I. Rahlff; P-U Tunn; P. Hohenberger. *Salmonella* osteomyelitis in an immunocompromized patient presenting as a primary lymphoma of the bone. *Int. J. of Infect. Dis.* 13 (2009): e67-e70.

Schwartz, K.J. *Samonellosis*. En: *Enfermedades del Cerdo*, 8va edición. Straw, B.E.; S. D’Allaire; W.L. Mengeling; D.J. Taylor (eds.) Editorial Inter-Médica, tomo 1 (2000): 501-513.

Sha, Q.; A. Gunathilake; M.R.J. Forstner; D. Hahn. Temporal analyses of the distribution and diversity of *Salmonella* in natural biofilms. *Syst. and Appl. Microb.* 34 (2011): 353–359.

Silva, L.E.; C.P. Gotardi; R. Vozzotto; J.D. Kich; M.R.I. Cardoso. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul de Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 (4) (2006): 455-461.

Smith, H. & J. Jones. Observations on experimental oral infection with *Salmonella Dublin* in calves and *S. choleraesuis* in pigs. *J. Pathology* 93 (1967): 141-156.

Spector, M.P. & W.J. Kenyon. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res. International* (2011), doi:10.1016/j.foodResearch2011.06.056.

Stone, G.G.; R.D. Oberst; M.P. Hays; S. Mcvey; M.M. Chengappa. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. of Clin. Microb.* Vol. 32, No. 7 (1994): 1742-1749.

Swaminathan, B. & T. Barrett. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. *J. Microb. Methods* 23 (1992): 129-139.

Swaminathan, B.; T. Barrett; S. Hunter; R. Tauxe. Pulsenet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emergin Infec. Dis.* 7 (2001): 382-389.

Taskila, S.; M. Tuomola & H. Ojamo. Enrichment cultivation in detection of foodborne *Salmonella*. *Food Control* 26 (2012): 369-377.

Tenovar, F.C.; R.D. Arbeit; R.V. Goering; P.A. Mickelsen; B.E. Murray; D.H. Persing; B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microb.* 33 (1995): 2233-2239.

Tizar, I.R. *Inmunidad de las superficies corporales.* En: Introducción a la Inmunología Veterinaria, 8va edición. Elsevier España S.L. Barcelona, España. (2009): 245-248.

Torres, G.J.; F.J. Piquera; L. Algarra; C. de Frutos; O.J. Sobrino. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. *Prev. Vet. Med.* 98 (2011): 81–87.

van der Wolf, P.J.; D.M.A. Lo Fo Wong; W.B. Wolbers; A.R.W. Elbers; F.W. van Schie; W.A. Hunneman; P. Willeberg; M.J.M. Tielen. A longitudinal study of *Salmonella* infections in finishing swine herds in The Netherlands. *The 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 2000: 205.

van Duijkeren, E.; W.J.B. Wannet; D.J. Houwers; W. van Pelt. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. of Clin. Microb.* 40 (11) (2002): 3980–3985.

Versalovic, J.; T. Koeth; R. Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteri and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Research*, 19 (24) (1991): 6823-6831.

Versalovic, J.; M. Schneider; F. Bruijn; J. Lupski. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology.* 5 (1994): 25-40.

Vigo, G.B.; J.A. Cappuccio; P.E. Piñeyro; A. Salve; M.A. Machuca; M.A. Quiroga; F. Moredo; G. Giacoboni; J.L. Cancer; M.I. Caffer; N. Binsztein; M. Pichel; C.J. Perfumo. *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles – Longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm. *Foodborne Path. and Dis.* 6(8) (2009): 965-972.

Vo, A.T.T.; E. van Duijkeren; A.C. Fluit; M.E.O.C. Heck; A. Verbruggen; H.M.E. Maas; W. Gaastra. Distribution of *Salmonella enterica* serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90.

Vet. Microb. 113 (2006): 153–158.

Voetsch, C.A.; T.J. Van Gilder; F.J. Angulo; M.M. Farley; S. Shallow; R. Marcus; P.R. Cieslak; V.C. Deneen; R.V. Tauxe. FoodNet estimate of the burden of illness caused by Nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 38 (Suppl 3) (2004): S127–34.

Vyt, P.; K. De Waele; N. Nollet; P. Heylen; D. Maes. Effect of transport and holding on *Salmonella* shedding in slaughter pigs. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, 2006. Volume 1. Abstract No: O.40-04.

Walters, M. & V. Sperandio. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Review. *Int. J. of Med. Microb.* 296 (2006): 125-131.

Weigel, R.M.; B. Qiao; B. Teferedegne; D.K. Suha; D.A. Barber; R.E. Isaacson; B.A. White. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Vet. Microb.* 100 (2004): 205–217.

Weigel, R.M.; D. Nucera; B. Qiao; B. Teferedegne; D. Kyun Suh; D.A. Barbel; P.B. Bahnsen; R.E. Isaacson; B.A. White. Testing an ecological model for transmission of *Salmonella enterica* in swine production ecosystems using genotyping data. *Prev. Vet. Med.* 81 (2007): 274-289.

Wilcock, B.P.; C.H. Armstrong & H.J. Olander. The significance of the serotype in the clinical and pathologic features of naturally occurring porcine salmonellosis. *Can. J. Comp. Med.* 40 (1976): 80-88.

Wilcock, B.P. & K.J. Schwartz. Salmonellosis. In: A.D. Leman; B.E. Straw; W.L. Mengeling; S. D’Allaire; D.J. Taylor, eds. *Diseases of Swine*. 7th ed, Iowa State University Press, Ames, IA, (1992): 570–583.

Williams, D.R.; D. Hunter; J. Binde; E. Hough. Observations on the occurrence of *Salmonella Choleraesuis* and other *Salmonellas* in two herds of feeder pigs. *J. Hyg. Camb.* 86 (1981): 369–377.

Wood, R.L.; A. Pospischil & R. Rose. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* 50 (1989): 1015–1021.

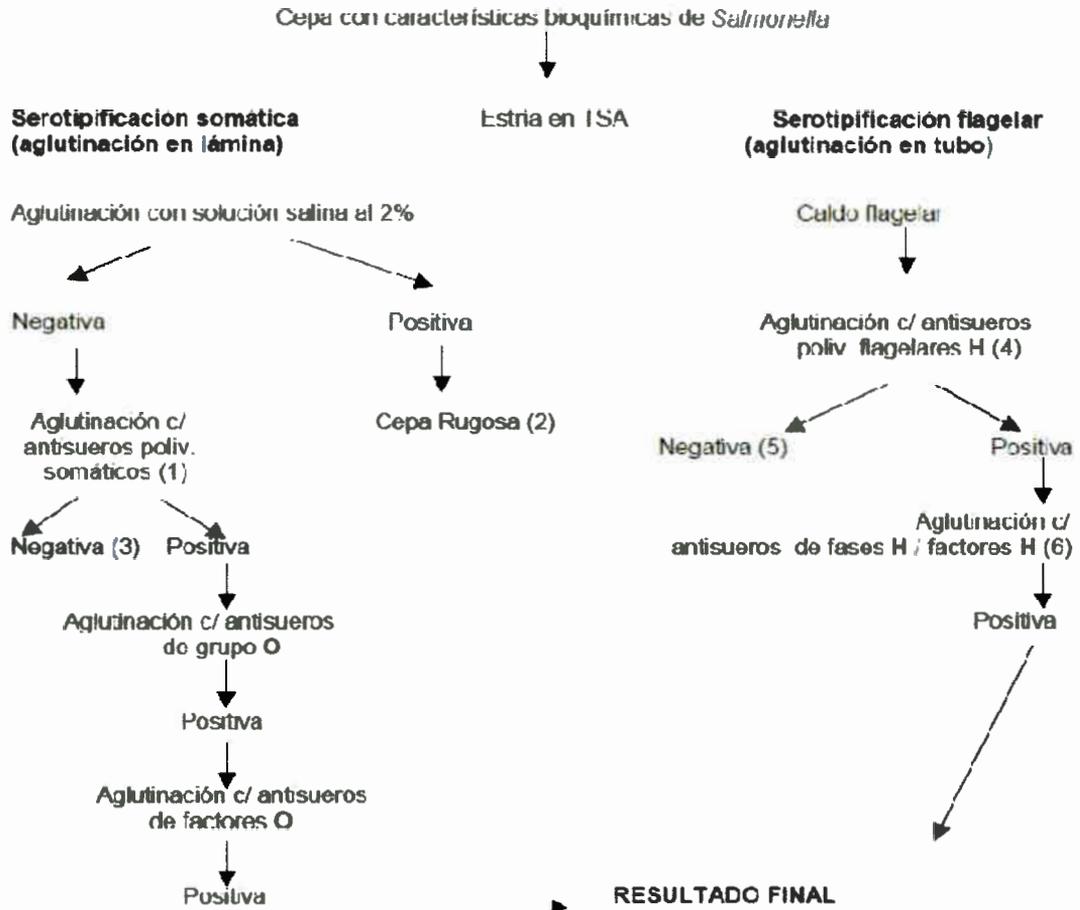
ANEXO 1

<i>Salmonella</i> serovars	Slaughter pigs	Humans	Feed (pigs, oil seed and fruit)	Broilers flocks	Laying hens holdings	Turkeys flocks
<i>S. Typhimurium</i>	1,040	19,009	Yes	65	123	86
<i>S. Derby</i>	380	484	Yes	13	14	123
<i>S. Rissen</i>	151	105	Yes	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	126	91,325	Yes	538	899	55
<i>S. Anatum</i>	63	159	Yes	32	21	-
<i>S. Bredeney</i>	51	160	Yes	10	26	186
<i>S. Infantis</i>	49	1,261	Yes	295	171	72
<i>S. London</i>	33	88	-	-	-	31
<i>S. Brandenburg</i>	31	243	-	-	-	-
<i>S. Agona</i>	28	388	Yes	16	38	31
<i>S. Newport</i>	24	751	Yes	8	11	33
<i>S. Montevideo</i>	19	359	Yes	31	27	13
<i>S. Bovismorbificans</i>	15	304	-	-	-	-
<i>S. Goldcoast</i>	14	143	-	-	-	-
<i>S. Gripe</i>	11	191	Yes	-	-	-
<i>S. Livingstone</i>	9	86	Yes	39	50	-
<i>S. Thompson</i>	9	196	Yes	-	-	-
<i>S. Hadar</i>	8	726	-	59	53	152

Tabla: Número de aislamientos de los serotipos de *Salmonella enterica* en cerdos en frigorífico, alimentos, humanos (ECDC), pollos, gallinas y pavos reportados por la Autoridad Europea para la Salud Alimentaria (Anonymous, 2008b).

ANEXO 2

Manual de Procedimientos de la Global Salmonella Surveillance – OMS, Parte I



- (1) Antisueros polivalentes somáticos: OS-A y OS-B
- (2) Para revertir una cepa de la forma rugosa a lisa, se realizan subcultivos en agar sangre o Mueller Hinton. Si no es posible revertir la rugosidad, se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación flagelar H.
- (3) Ver Consideraciones a tener en cuenta en "Serotipificación somática"
- (4) Antisueros polivalentes flagelares: IIS-1; IIS-A; IIS-B; IIS-C
- (5) Ver Consideraciones a tener en cuenta en "Serotipificación flagelar"
- (6) Si la serovariedad de *Salmonella* es difásica y sólo expresa una fase, realizar "Método de inversión de fases"

Figura: Esquema del flujograma de serotipificación de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, utilizado por el Servicio de Enterobacterias del INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina.



U.N.R.C.
Biblioteca Central

71116



71116