

PARADA, JULIAN
Deteccion y caracter

73200



2014

73200

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *SALMONELLA* EN CERDOS
Y SU COMPARACIÓN CON AISLAMIENTOS EN HUMANOS
EN ARGENTINA

Trabajo de tesis presentado por

MV. Julián Parada

para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA
E INNOVACIÓN AGROPECUARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO



UNIVERSIDAD FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

DIRECTORES:

M.V. MSc Arnaldo Ambrogi

Lic. Dra. Mariana Gabriela Pichel

Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria.

Universidad Nacional de Río Cuarto.

Marzo de 2014

00587

00587

73200

MFN:
Clasif:
T. 862



**DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA
E INNOVACIÓN AGROPECUARIA**



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE RÍO CUARTO**



UFRRJ
**UNIVERSIDAD FEDERAL RURAL
DO RÍO DE JANEIRO**

CONICET



DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *SALMONELLA* EN CERDOS Y SU COMPARACIÓN CON AISLAMIENTOS EN HUMANOS EN ARGENTINA

MV. Julián Parada

Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria

Universidad Nacional de Río Cuarto

RESUMEN

La salmonelosis en cerdos es una enfermedad que produce grandes pérdidas económicas en la producción porcina y constituye uno de los vehículos más importantes para las infecciones en humanos. Sin embargo, poco se conoce sobre la presencia de *Salmonella* en cerdos de Argentina. Los objetivos de este trabajo fueron detectar y caracterizar las poblaciones de *Salmonella* spp. presentes en cerdos y compararlas con aislamientos de casos clínicos en humanos en el país. Para esto, se tomaron muestras de materia fecal de cerdos en edad de faena en 52 granjas de 7 provincias argentinas. La prevalencia de granjas positivas a *Salmonella* spp. fue del 42%, con una media de 4,4% (95% IC = 2,5 – 6,2) cerdos que excretaban la bacteria en heces en cada granja positiva. Se procesaron 1.518 muestras de materia fecal, de las que se recuperaron 97 aislamientos de *Salmonella enterica* que fueron clasificadas en 12 serovariedades, entre las que *S. Typhimurium* y *S. Derby* fueron las más frecuentemente aisladas. Se obtuvieron 35 perfiles genéticos por *xbal*-PFGE, con lo que se identificaron subtipos genéticos de *S. Typhimurium* en diferentes granjas. Además, al ser comparadas con la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella* se logró identificar cepas con agrupamientos similares, e inclusive pulsotipos idénticos, con cepas aisladas en hospitales de casos clínicos en humanos. Estos resultados demuestran la amplia distribución de *Salmonella* en la producción porcina argentina y la presencia de cepas compartidas entre los cerdos y humanos en el país, lo que plantea la necesidad de evaluar la implementación de medidas de control de este patógeno en la producción porcina nacional.

Dedicado a Elsa y Luís, mis adorados padres...

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Argentina, que me posibilitó una educación y formación profesional de grado y postgrado; y a la Universidad Nacional de Río Cuarto y CONICET que fueron los instrumentos para que esto fuera posible.

En el plano personal, debo agradecer a mi papá, al que extraño día a día, 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 estadías en la capital; a male por el amor y aguante en tiempos de trabajo, 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 mi director naly Ambrogí por la formación profesional adquirida a su lado; a Mariana Pichel por su predisposición y “guía molecular” constante; a Alicia Carranza y Pablo Camacho por su apoyo y amistad; a Mirian Moroni y todo el equipo de trabajo del Servicio de Enterobacterias del INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán” por su colaboración desinteresada; a las autoridades de SENASA, en especial a Mariela Monterubbianesi y Mariana Herrera por su predisposición y participación en el muestreo en granjas; a todos mis compañeros del Departamento de Patología Animal, docentes y no docentes, por ser una fuente de consulta y colaboración en las tareas cotidianas; y a los ayudantes de cátedra y de investigación por su contribución y compañía diaria.

GRACIAS...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN GENERAL	
<i>Género Salmonella</i>	1
Salmonelosis	4
Salmonelosis en el cerdo	6
Detección y caracterización de <i>Salmonella</i>	9
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPITULO I	
Desarrollo de un protocolo rápido y eficaz para la detección de <i>Salmonella</i> spp. en materia fecal de cerdo	
I.A. INTRODUCCIÓN	
I.A.1. Diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp.	20
I.A.2. El aislamiento bacteriológico	21
I.A.3. La Reacción en Cadena de la Polimerasa	23
I.B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
I.C. MATERIALES Y MÉTODOS	
I.C.1. Muestras	28
I.C.2. Aislamiento bacteriológico	
a) Pre-enriquecimiento no selectivo	28
b) Enriquecimiento selectivo	28
c) Siembra en placas de agar selectivo	29
d) Lectura de placas	29
e) Subcultivo de colonias sospechosas	29
I.C.3. Serotipificación de aislamientos	29

I.C.4. PCR	
a) Extracción de ADN	30
b) Reacción de PCR	30
c) Ciclado	31
d) Preparación del gel de agarosa	31
e) Electroforesis	31
f) Observación de fragmentos	32
I.C.5. Análisis Estadístico	32
I.D. RESULTADOS	34
I.E. DISCUSIÓN	
I.E.1. Diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp.	38
I.E.2. Sensibilidad Relativa	39
I.E.3. Sensibilidad y Especificidad	43
CAPÍTULO II	
Prevalencia de granjas infectadas y serovariedades de <i>Salmonella enterica</i> presentes en cerdos en la Argentina	
II.A. INTRODUCCIÓN	
II.A.1. Producción porcina en la Argentina	47
II.A.2. <i>Salmonella</i> en la producción de cerdo	48
II.A.3. Salmonelosis en la granja	54
II.B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
II.C MATERIALES Y MÉTODOS	
II.C.1. Población y muestras	58
a) Muestreo dentro de la granja	60
II.C.2. Aislamiento bacteriológico	61
a).Pre-enriquecimiento no selectivo	61
b) Enriquecimiento selectivo	62
c) Siembra en placas de agar selectivo	62
d) Lectura de placas	62
e) Subcultivo de colonias sospechosas	62
II.C.3. Reacción de PCR	63
a).Re-aislamiento de colonias sospechosas	63

b) Extracción de ADN	63
c) Ciclado	63
II.C.4. Serotipificación	63
II.C.5. Subtipificación genética de cepas	64
a).Preparación de las cepas	64
b) Preparación de bloques de agarosa	65
c) Lisis celular	65
d) Lavado de bloques de agarosa	65
e) Digestión del ADN	65
f) Preparación del gel de agarosa	66
g) Electroforesis	66
h) Tinción y documentación del gel	66
i) Comparación de pulsotipos	67
II.D. RESULTADOS	
II.D.1. Granjas Muestreadas	68
II.D.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos de <i>Salmonella</i>	71
II.D.3. Caracterización genotípica de los aislamientos de <i>Salmonella</i>	73
II.E. DISCUSIÓN	
II.E.1. Importancia del muestreo	76
II.E.2. Prevalencia de granjas infectadas por <i>Salmonella</i> en la Argentina: Comparación con datos mundiales.	78
II.E.3. Caracterización de las granjas cuyos cerdos excretan <i>Salmonella</i> en heces en Argentina	82
II.E.4. Caracterización fenotípica de las poblaciones de <i>Salmonella</i> en cerdos en Argentina	87
II.E.5. Caracterización genotípica de las poblaciones de <i>Salmonella</i> en cerdos en Argentina	90
CAPÍTULO III	
Relación genética entre cepas aisladas en cerdos y cepas aisladas en humanos	
III.A. INTRODUCCIÓN	
III.A.1. Salud Pública	94
III.A.2. Salmonelosis y animales de consumo	95

III.A.3. Epidemiología Molecular	96
III.B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	99
III.C. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.C.1. Base de Datos	100
III.C.2. Comparación de perfiles de ADN	100
III.D. RESULTADOS	102
III.D.1. <i>S. Anatum</i>	102
III.D.2. <i>S. Bredeney</i>	103
III.D.3. <i>S. Derby</i>	103
III.D.4. <i>S. Heidelberg</i>	105
III.D.5. <i>S. Infantis</i>	106
III.D.6. <i>S. Oranienburg</i>	107
III.D.7. <i>S. Typhimurium</i>	108
III.E. DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES GENERALES	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp.	31
Tabla 2: Resultado de las 40 muestras de materia fecal procesadas por PCR en el medio de pre-enriquecimiento (APT), en el segundo paso de cultivo (RV) en 3 tiempos diferentes y al protocolo de cultivo bacteriológico completo	35
Tabla 3: Sensibilidad relativa de la PCR en los diferentes pasos y tiempos de cultivo, y del protocolo bacteriológico completo	36
Tabla 4: Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la PCR a partir del medio de pre-enriquecimiento (APT) y del enriquecimiento (RV) en 3 tiempos de cultivo, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia.	37

Tabla 5: Detalle de las 52 granjas muestreadas, indicando código, origen, número de madres, aislamiento bacteriológico, muestras tomadas y porcentaje de muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp. en cada granja	70
---	----

Tabla 6: Serotipificación de los aislamientos de <i>S. enterica</i> recuperados de materia fecal de cerdos de granjas en Argentina.	72
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: PCR de materia fecal con 24 h de cultivo en APT	36
Figura 2: Distribución de la existencia porcina en la Argentina	58
Figura 3: Georeferenciación de las granjas muestreadas, especificando cuales fueron negativas y positivas para la presencia de <i>Salmonella</i> spp.	69
Figura 4: Porcentaje de granjas positivas a <i>Salmonella</i> spp. según el número de cerdas madre	71
Figura 5: Frecuencia de identificación, en número de granjas, de las serovariedades de <i>S. enterica</i> en las 22 granjas positivas	73
Figura 6: Dendrograma con los perfiles de <i>Xba</i> I-PFGE de las principales serovariedades aisladas en materia fecal de cerdos, con su respectiva granja de origen	74
Figura 7: Dendrograma con los perfiles de <i>Xba</i> I-PFGE de las cepas de <i>S. Derby</i> aisladas en materia fecal de cerdos, con su respectiva granja de origen	75
Figura 8: Dendrograma con los perfiles de <i>Xba</i> I-PFGE de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> aisladas en materia fecal de cerdos, con su respectiva granja de origen	75
Figura 9: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Anatum</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	102
Figura 10: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Bredeney</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	103
Figura 11: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Derby</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	104
Figura 12: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Heidelberg</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	105
Figura 13: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Infantis</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	106
Figura 14: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Oranienburg</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	107

Figura 15: Cantidad de aislamientos de los pulsotipos de <i>S. Typhimurium</i> registrados en la Base de Datos, que fueron relacionados a los aislados en cerdos	108
Figura 16: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Typhimurium</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	108
Figura 17: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Typhimurium</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	109
Figura 18: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Typhimurium</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	110
Figura 19: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Typhimurium</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	111
Figura 20: Dendrograma con los pulsotipos de <i>S. Typhimurium</i> aisladas de Animales, Humanos y Alimentos	112

INTRODUCCIÓN

GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Género *Salmonella*

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* (*S. 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 *S. 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.

En forma general, los microorganismos del género *Salmonellae* se caracterizan fenotípica y fisiológicamente por ser bacilos Gram negativos (0,7 a 1,5 x 5 µm), no fermentadores de lactosa. Son móviles por medio de flagelos periticos, con la excepción de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*. Fermentan glucosa con producción de 8 ácido y gas (excepto *S. Typhi*). También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita. Son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativo y producen SH₂.

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 y Kenyon, 2012). Sólo la invasión y supervivencia intracelular está 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, *S. 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 posibles condiciones de estrés (Spector y Kenyon, 2011), sino también para la regulación de los mecanismos genéticos requeridos en la patogénesis de *S. enterica* según el huésped. En este sentido, Bearson y 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* spp., mediante la expresión de factores de virulencia codificados en su estructura genética según el huésped.

Salmonelosis

Las infecciones por *Salmonella* spp. en cerdos son de importancia por dos razones principales. Por un lado, la enfermedad clínica (salmonelosis) que afecta a los cerdos y que produce grandes pérdidas económicas por impactar sobre índices productivos como la mortalidad, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia (Carlson y col., 2012). Por otro lado, desde el punto de vista de la Salud Pública, las infecciones causadas por *Salmonella* spp. en el hombre constituyen una de las enfermedades zoonóticas más importantes en el mundo (EFSA, 2013).

La relevancia del problema en producción animal se ve reflejada en reportes de Muirhead y Alexander (2001), quienes plantean que la mortalidad producida en cuadros de salmonelosis, sumado a las pérdidas de producción y la afeción de los índices de conversión, generan un costo estimado de £16.200/año/cada 100 madres en producción. Esto se relaciona no solo a los cuadros clínicos digestivos, sino también a presentaciones subclínicas donde se comprobó que la presencia de *Salmonella* spp. afecta la maduración y composición normal de la microbiota intestinal, cambios que podrían significar un detrimento en el desempeño productivo de los animales infectados (Bearson y col., 2013).

En Salud Pública, las infecciones causadas por *Salmonella* spp. afectan a todos los grupos etarios, presentando cuadros más severos en niños menores de 5 años, ancianos e inmunocomprometidos (Lakshmaiah y col., 2009; Schulze y col., 2009;

Ramos Moreno *y col.*, 2010). 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 y Wierup, 2006).

La Unión Europea (UE), a través de los reportes epidemiológicos de la *European Food Safety Authority* (EFSA), comunicó que en el año 2011 se presentaron 95.540 casos de salmonelosis no-tifoidea en esa región (EFSA, 2013). En Los Estados Unidos, Voetsch *y col.* (2004) estimaron que alrededor de 1,4 millones de personas por año manifiestan cuadros de salmonelosis no-tifoidea, lo que resulta en 15.000 hospitalizaciones y 400 muertes por año en ese país. 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 (Miller *y col.*, 2005). Sumado a esto, según un estudio europeo, 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).

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 (Directiva Europea 2003/99, Regulación –EC- N°2160/2003, Regulación -EC- N°668/2006).

En la Argentina, la salmonelosis no-tifoidea no es una enfermedad de notificación obligatoria. El Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, recibe aislamientos de *Salmonella* 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, como también aislamientos de origen animal y de alimentos. Según sus informes, en los últimos años las serovariedades *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Infantis* han sido las más frecuentes en casos clínicos en humanos, mientras que en animales los serotipos más frecuentemente aislados fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* y *S. Dublin*, con variaciones de acuerdo a la especie animal (Caffer *y col.*, 2007). Algunos otras serovariedades aisladas en cerdos fueron *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Bovismorbificans* y *S. Schwarzengrund*, entre otras (Parada *y col.*, 2008; Ibar *y col.*, 2009; Parada *y col.*, 2013). Sin embargo, no se cuenta con información estadística sobre la frecuencia de presentación de estas serovariedades en la producción porcina nacional, ni de su posible relación con aquellas reportadas en casos de salmonelosis en humanos.

Salmonelosis en el cerdo

Desde el primer reporte de aislamiento de *S. Choleraesuis* realizado por Salmon y Smith (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 *S. enterica* se 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 y 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. Asimismo, 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 h 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 y Jones, 1967). Del mismo modo, en casos de infecciones por *S. Typhimurium* se observó la excreción de más de 10^7 ufc/g materia fecal (Gutzmann y col., 1976).

Se considera que la principal ruta de transmisión de serotipos virulentos de *S. 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 la vía 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 otros 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 y Harris, 2004, 2005). Sin embargo, como ya ha sido mencionado, las concentraciones de este patógeno en la materia fecal de cerdos con cuadros clínicos puede superar ampliamente esta cantidad.

Salmonella 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 hiper-agudos. 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 de la piara (Griffith *y col.*, 2006).

La diarrea tiene una duración de 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), asociaron la presencia de bajos números de *Salmonella* en el contenido de colon con el incremento de temperatura corporal del animal, a partir de infecciones experimentales. Los autores reportaron que el 33,3% de los animales manifestaron 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 recuperan completamente, aunque una proporción puede quedar como portador y excretar *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).

Detección y caracterización de *Salmonella*

La metodología diagnóstica para establecer la prevalencia de cerdos infectados en una piara es variable según los objetivos que se persigan. La serología, especialmente a partir de pruebas de ELISA para detectar anticuerpos contra *Salmonella* spp. permite conocer si los cerdos pueden haber estado expuestos a este patógeno y, además, han sido propuestos diversos sistemas de clasificación para categorizar piaras de baja, moderada o alta prevalencia, que permitan luego tomar medidas estratégicas de control según el nivel de infección (Møgelmoose y col., 2000; van der Wolf y col., 2001; Alban y col., 2002; de Vos y col., 2007; Hofshagen y col., 2008; Alban y col., 2012). Esta técnica sin embargo, presenta grandes dificultades ya que la sola detección del agente por serología puede ser muy variable, con animales infectados que nunca seroconvierten (Kranker y col., 2003), y principalmente por no permitir la caracterización de las poblaciones de *Salmonella* que pueden estar presentes, información necesaria a la hora de evaluar e implementar medidas de control.

En forma general, la mayoría de los programas de control en cerdos incluyen algún tipo de cultivo bacteriológico de muestras de heces, o de una serie de órganos como tonsilas y ganglio mesentéricos ileocecales (GMI) tomados durante la faena, que permiten caracterizar las poblaciones de *Salmonella* presentes en estos animales (Funk, 2003; Nollet y col., 2005; Nowak y col., 2007; Magistrali y col., 2008). Cabe recordar 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). La posibilidad de supervivencia intracelular en animales asintomáticos posee gran relevancia en el mantenimiento de las infecciones entre cerdos (Wilcock y Schwartz, 1992), y para la detección de animales portadores en frigorífico. A esto se suma la presencia de sistemas de *quorum-sensing* que 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 y Sparandio, 2006).

Diferentes sistemas de monitoreo en plantas de faena han sido ampliamente utilizados en los últimos años 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 (EFSA, 2006b). La Unión Europea fue de las primeras en implementar un diagnóstico de situación regional de la presencia de *Salmonella* spp. en los cerdos faenados (Regulación -EC- N°668/2006), lo que brindó información elemental para establecer diferentes programas de control en la cadena de producción de carne de cerdo de sus Estados Miembros. Aunque esta información es de enorme importancia para la seguridad alimentaria de la población, es difícil saber si estos datos representan la situación real de 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* (Erdman y col., 2003; Vyt y col., 2006; Mannion y col., 2012).

Algunos ejemplos de las dificultades del monitoreo en plantas de faena pueden verse en Loynachan y Harris (2005), quienes expusieron cerdos a *S. Typhimurium* a través de la vía intranasal y ambiental y 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 tan solo 3 h post-infección. Magistrali y col. (2008) en un estudio de la dinámica de la infección por *Salmonella* en una granja, desde el ingreso de los cerdos hasta su salida para faena, encontraron diferencias en las serovariedades aisladas en granja con las variedades de mayor frecuencia de presentación en GMI, contenido cecal e hisopados de la canal en frigorífico. Demostraron además, que las serovariedades aisladas de los cerdos faenados coincidían con las aisladas en el camión de transporte de esos animales, con perfiles genéticos idénticos. Erdman y col. (2003) también encontraron diferencias entre las serovariedades y genotipos de *Salmonella* spp. aislados de materia fecal de cerdos dentro de la granja, con aquellos aislados de GMI 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.

Las discutida validez del monitoreo en frigorífico para conocer la situación de este patógeno en una granja, plantean la necesidad de utilizar muestras tomadas directamente en los establecimientos, y las heces de los cerdos constituyen una de las materias primas más representativas. Uno de los factores importantes a considerar para establecer el nivel de infección de una población por bacteriología de materia fecal se desprenden del estudio realizado por Guenther y col. (2010), donde se 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 selectivo y diferencial 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 que excretan *Salmonella* en heces se define como una técnica que poseen una altísima especificidad, pero, los diferentes protocolos que se pueden utilizar se caracterizan por una sensibilidad variable, y muchas veces, poco satisfactoria (Funk, 2003).

Una alternativa propuesta recientemente es la detección rápida del agente por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis y col., 1986; Stone y col., 1994), que permite obtener resultados específicos con elevada sensibilidad, en comparación con las técnicas de cultivo tradicionales. En el caso específico de la detección en muestras de alimentos y animales, se han implementado diferentes protocolos que recomiendan la inclusión de un control interno de amplificación (Malorny y col., 2003 a, b).

Aunque la identificación temprana de *Salmonella* por PCR podría ser útil como método tamiz o “screening”, el aislamiento de la misma sigue siendo necesario para determinar otros aspectos relacionados al patógeno que tienen correspondencia con programas de control y erradicación, y de impacto en salud pública, como lo son:

a) serotipificación: como se ha descrito, varias serovariedades de *Salmonella* no-tifoidea son comunes del cerdo y los humanos, por ello se considera fundamental

como primer paso en la vigilancia e investigación determinar los distintas serovariedades y su frecuencia de presentación en la región de interés para este estudio, estudio, para inferir programas de control adecuados para la salud humana y animal.

b) subtipificación: el uso de técnicas moleculares para investigaciones epidemiológicas ha logrado un gran desarrollo (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 *y col.*, 1992; Versalovic *y col.*, 1994; Olive *y col.*, 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. Entre estas técnicas, la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE), es considerada el “gold standard” por su alto poder discriminatorio y reproducibilidad y ha sido ampliamente utilizada para la subtipificación de *Salmonella* spp. (Weigel *y col.*, 2004; Sandt *y col.*, 2006; Kérouanton *y col.*, 2007; Magistrali *y col.*, 2008), siendo la metodología de elección en el marco de la Red PulseNet Internacional (Swaminathan *y col.*, 2001).

c) resistencia a antimicrobianos: el control y tratamiento de las infecciones por *Salmonella* no-typhi, tanto en animales como en el humano, se realiza principalmente mediante la utilización de antimicrobianos (Carlson *y col.*, 2012). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la aparición de cepas multirresistentes a drogas de uso frecuente. Esto ha dificultado el control de la salmonelosis en cerdos, incrementando las pérdidas en los sistemas productivos, como así también el riesgo en el contagio de humanos por cepas multirresistentes de difícil tratamiento (Paphitou, 2013). En este contexto, el aislamiento de la bacteria permite realizarle pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos, y con esto determinar el tratamiento adecuado a cada caso en particular, favoreciendo el uso racional de antibióticos (CLSI, 2008; Paphitou, 2013).

La cadena de la carne porcina argentina ha experimentado un crecimiento importante en los últimos 10 años, donde según los registros de faena del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación, la faena de cerdos en 2013 duplicaría las toneladas de res con hueso que se registraron en 2003 y se espera un crecimiento aún mayor de sector porcino para la próxima década. A fin de asegurar al mercado interno, y posiblemente internacional, no sólo calidad y cantidad, sino principalmente sanidad de los animales, es necesario incorporar planes de vigilancia y control de las patologías más frecuentes en cerdos. Para esto, se pueden diseñar nuevas estrategias o incorporar programas internacionales de control que han tenido éxito en otros países. En relación a la prevención y control de la salmonelosis, es necesario como primer paso conocer la situación real de *Salmonella* spp. en la producción porcina del país, los serotipos circulantes y la relación genética entre ellos, información fundamental para elaborar o adaptar un programa a la medida de lo necesario.



HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- i. Las poblaciones de *Salmonella* spp. presentes en cerdos de diferentes granjas en Argentina poseen características fenotípicas y genotípicas compartidas, de relevancia para la planificación de estrategias de control.
- ii. Las serovariedades de *Salmonella* spp. aisladas de humanos se relacionan genéticamente con aquellas aisladas de cerdos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de granjas cuyos cerdos en edad de faena excretan *Salmonella* spp. en sus heces en Argentina, caracterizando las poblaciones bacterianas según el fenotipo y el genotipo, para finalmente compararlas con cepas aisladas de casos clínicos de salmonelosis en humanos en el país.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I

Desarrollo de un protocolo rápido y eficaz para la detección de *Salmonella* spp. en materia fecal de cerdo.

a) Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de materia fecal de cerdos en edad de faena por medio de distintos protocolos de trabajo que comprendan métodos de aislamiento bacteriológico y PCR usando cebadores específicos.

b) Evaluar un protocolo rápido y eficaz para la detección de animales que excretan *Salmonella* en sus heces.

c) Comparar la sensibilidad y especificidad de los diversos protocolos diagnósticos evaluados.

CAPÍTULO II

Prevalencia de granjas infectadas y serovariedades de *Salmonella enterica* presentes en cerdos en la Argentina

d) Determinar la prevalencia de granjas cuyos cerdos en edad de faena excretan *Salmonella* spp. en sus heces, en el área de mayor producción porcina de Argentina.

e) Establecer la frecuencia de presentación de las diferentes serovariedades de *S. enterica* en cerdos en edad de faena.

f) Evaluar la diversidad genética de los aislamientos de diferentes serovariedades de *S. enterica* identificados en cerdos en el país.

g) Analizar la distribución geográfica de las diferentes cepas identificadas.

CAPÍTULO III

Relación genética entre cepas aisladas en cerdos y cepas aisladas en humanos

h) Establecer la posible relación genética entre los aislamientos recuperados de cerdos y aislamientos de casos clínicos de salmonelosis en humanos.

CAPITULO I

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO RÁPIDO Y EFICAZ

PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP.

EN MATERIA FECAL DE CERDO

A. INTRODUCCIÓN

1. Diagnóstico de *Salmonella* spp.

Se conoce una gran variedad de técnicas y protocolos que son utilizados para la detección de *Salmonella* spp. en los diferentes sustratos donde puede estar presente, como muestras de alimento, ambientales, agua, tejidos y heces. Entre estas técnicas podemos encontrar el cultivo bacteriológico (Guenther y col., 2010; De Busser y col., 2013), la hibridización *in situ* (Viera Pinto y col., 2008), y la PCR (Malorny y Hoorfar, 2005; Adley y col., 2011). Dentro de esta última, se han utilizado diferentes genes para la detección del patógeno, como los genes de virulencia *invA* (Rahn y col., 1992; Stone y col., 1994), *invB* (Bronstein y col., 2000), *invE* (Stone y col., 1994); o genes de las fimbrias como *fimA* (Cohen y col., 1996), *fimY* (Yeh y col., 2002) y *sefA* (Doran y col., 1996). Sin embargo, la detección del fragmento identificado como *invA* ha sido propuesta como la más adecuada en los estudios epidemiológicos, por ser un gen muy conservado en el género, y vinculado a la patogenicidad de la bacteria al participar en el mecanismo de invasión celular (Rahn y col., 1992; Malorny y col., 2003a, b). Recientemente, han cobrado importancia en el diagnóstico una serie de técnicas basadas en PCR como la secuenciación del 16S rRNA (Bearson y col., 2013), RAPD-PCR (Trevanich y col., 2010), qPCR (Jensen y col., 2013), entre otras.

La principal técnica en uso actualmente es el estudio bacteriológico de esos sustratos a partir de diferentes protocolos y medios de cultivo con el objeto de lograr recuperar la bacteria. Esto permite trabajar con el aislamiento para alcanzar una identificación completa, como la serovariedad, el genotipo o inclusive el perfil de sensibilidad a antimicrobianos, información que es fundamental para establecer medidas de control específicas o conocer la epidemiología poblacional y el riesgo de infección para esta bacteria. Sin embargo, los protocolos de cultivo convencionales son laboriosos y requieren de entre 4 y 6 días para obtener un resultado (Funk, 2003),

debido a que contienen una serie de pasos consecutivos a seguir para aumentar su eficacia (Taskila *y col.*, 2012). Es así que generalmente incluyen un primer cultivo no selectivo en un medio enriquecido, el más frecuentemente utilizado es el Agua de Peptona Bufferada (APB), que permite la recuperación de aquellas bacterias que pudieran estar injuriadas y que no crecerían en medios hostiles. Posteriormente se realiza un cultivo selectivo (dirigido), donde a partir de medios con inhibidores o de temperaturas de cultivo elevadas, se intenta favorecer el crecimiento de *Salmonella* spp. por sobre otras poblaciones bacterianas sensibles (Caffer *y col.*, 2008; Taskila *y col.*, 2012). Por último, se utilizan medios sólidos selectivos y diferenciales para lograr el aislamiento e identificación de las colonias de *Salmonella* (De Busser *y col.*, 2013).

Cada paso dentro del protocolo bacteriológico requiere de entre 18 y 24 h de cultivo, lo que da un mínimo de 3 días para lograr un resultado, sin tener en cuenta un día más para la confirmación del aislamiento a partir de pruebas fisiológicas (bioquímicas) (Caffer *y col.*, 2008). A esto se suma que en algunos casos se recomiendan cultivos de 48 h en los medios selectivos para aumentar la sensibilidad de la técnica, sobre todo en casos de muestras de heces de animales con cuadros subclínicos de salmonelosis (Jensen *y col.*, 2013).

2. El aislamiento bacteriológico

El poder contar con la cepa aislada, con las ventajas que esto propone, hacen que la bacteriología se constituya como la “prueba de oro” en el diagnóstico de *Salmonella* spp., con una especificidad (capacidad de evitar resultados que sean falsos positivos) asumida como perfecta (100%), debido a la posibilidad de identificar en forma precisa el aislamiento obtenido (Funk, 2003). Sin embargo, su principal debilidad se encuentra en lo variable de su sensibilidad (capacidad de evitar resultados que sean falsos negativos), que además suele ser baja, sobre todo en matrices complejas como los alimentos (Kuyuncu y Haggblom, 2009), y más aún en heces (Davies *y col.* 2000). Esta

mayor complejidad de la materia fecal se entiende en la variabilidad físico química de su composición, así como también en la microbiota presente, que pueden influenciar a capacidad de la técnica en lograr el aislamiento de *Salmonella* spp. (Beggesen y col., 2007).

Una de las variables que ha sido vinculada a la sensibilidad de la bacteriología es la cantidad de muestra analizada. Funk y col. (2000), evaluaron la sensibilidad relativa del protocolo ISO 6579/02 ante muestras de hisopado rectal y fracciones de 1, 10 y 25 g de materia fecal de cerdos naturalmente infectados con *S. enterica*. Encontraron un efecto pronunciado del peso de la muestra en la sensibilidad relativa de la técnica, que se incrementó desde el 9% para los hisopados rectales, hasta el 78% para las fracciones de 25 g de materia fecal, aunque no hubo diferencia significativas entre las fracciones de 10 y 25 g. Otro resultado interesante de ese trabajo, es que encontraron muestras positivas sólo a alícuotas de 1 o 10 g, pero no al resto de las alícuotas tomadas de esa muestra, ni siquiera a fracciones de mayor tamaño. Por ello, los autores resaltan la importancia de la distribución heterogénea de *Salmonella* en las heces, sobre todo en animales con baja carga, y el efecto negativo que supone en la sensibilidad de la bacteriología.

Con respecto a la carga de *Salmonella* presente en la muestra de materia fecal, se sabe que el aislamiento de esta bacteria es de relativa facilidad en animales con cuadros clínicos de salmonelosis (Funk, 2003), ya que estos cerdos podrían excretar alrededor de 5×10^6 ufc/g de heces (Bearson y col., 2013), o hasta 8 logaritmos (Guenther y col., 2010). Sin embargo, según Bearson y col. (2013), en los cuadros subclínicos de la enfermedad la concentración de *Salmonella* en la materia fecal puede acercarse más a las 2×10^3 ufc/g de heces. En ese trabajo se observó también que si bien esos cerdos no cursaron con cuadros de diarrea, la infección por *Salmonella* en cerdos jóvenes (7-8 semanas de vida) modificó la progresión y

maduración de la microbiota intestinal normal, independientemente de si el animal cursó un cuadro de salmonelosis clínico o subclínico. Estos cambios en la composición de la microbiota, y por consiguiente en la salud intestinal de esos animales, adquieren gran importancia ya que podrían predisponerlos a futuras infecciones y alterar sus índices productivos (ganancia diaria de peso, conversión alimenticia).

La serovariedad de *S. enterica* presente ha sido también asociada a variaciones en la sensibilidad de la bacteriología, lo que puede estar relacionado a una variable capacidad de soportar y adaptarse mejor a condiciones de estrés, como las que pueden presentarse en medios de cultivo selectivos, según la presencia de mecanismos genéticos de adaptación (Spector y Kenyon, 2012). Jensen y col. (2013) en un estudio comparativo con materia fecal contaminada artificialmente, encontraron que la sensibilidad de detección y aislamiento fue menor en muestras contaminadas con cepas de *S. Dublin*, con respecto a aquellas con *S. Typhimurium*. Resultados similares fueron reportados por Eriksson y Aspan (2007).

Para Funk (2003) las variaciones que se presentan en el aislamiento bacteriológico de materia fecal hacen de esta técnica la “imperfecta prueba de oro” para el diagnóstico de *Salmonella* spp. en cerdos. En este sentido, Wilkins y col. (2010) coinciden en resaltar la dificultad que propone el hecho de que no exista una prueba de oro como tal, sino más bien una serie de protocolos bacteriológicos que se constituyen como la “prueba de referencia”.

3. La Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Desde los primeros protocolos publicados a fines del siglo XX por Mullis y col. (1986), la Reacción en Cadena de la Polimerasa, más conocida por sus siglas en inglés PCR, se ha establecido como una de las técnicas diagnósticas de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de casi cualquier patógeno. En la actualidad y para el caso particular del cerdo, es una de las técnicas más utilizadas para la detección de

agentes virales (Ramirez *y col.*, 2012), cómo también de bacterias, ya sea de origen respiratorio (Costa *y col.*, 2011) o digestivo (Phillip *y col.*, 2009; Adley *y col.*, 2011).

La identificación de un agente etiológico a partir de un segmento de ADN o ARN específico permitió incrementar la capacidad del laboratorio de diagnóstico para detectar patógenos en una muestra clínica, reduciendo los tiempos requeridos y posibilitando el diagnóstico en aquellos agentes bacterianos donde el cultivo bacteriológico convencional no es una opción (Phillip *y col.* 2009). Otra de las ventajas, es la general reducción de las concentraciones mínimas del agente necesarias para lograr detectarlas, lo que convierte a esta técnica en una buena opción para el diagnóstico en muestras con baja carga, como las que se presentan en animales con cuadros subclínicos (Bearson *y col.*, 2013). A esto se suma la posibilidad de descubrir bacterias independientemente del estado fisiológico de la misma, es decir, que permite realizar un diagnóstico en bacterias injuriadas donde los protocolos bacteriológicos no serían eficaces para su detección (Malorny y Hoorfar, 2005)

Aunque la PCR ha demostrado grandes cualidades para la detección y el diagnóstico de enfermedades, posee una marcada debilidad a sustancias que pueden actuar como inhibidores de reacción, como las ADNasas, proteasas y polisacáridos, que son frecuentes en el ambiente y pueden encontrarse en grandes cantidades en matrices complejas como las muestras de tejidos o alimentos (Wilson, 1997). Esto logra incrementar la posibilidad de falsos negativos, que se traduce en un pobre Valor Predictivo Negativo (VPN) de la técnica, situación poco deseable para la detección de animales que puedan diseminar un patógeno, sobre todo si se trata de uno zoonótico. Esta situación puede ser minimizada mediante el uso de un control interno de reacción (CIR) que nos indica si la reacción se produjo (Malorny *y col.* 2003a, b). Otra posibilidad, es el agregado de sustancias facilitadoras de la PCR, que interactúan con los inhibidores presentes, estabilizan la reacción y disminuyen la posibilidad de

falsos negativos (Wilson, 1997). Un ejemplo de estas sustancia facilitadoras de la PCR es la albúmina sérica bovina (BSA), que se demostró incrementa la efectividad de la PCR, disminuyendo los falsos negativos por reacciones inhibidas o con ADN degradado (Al-Soud y Radström, 2000).

Cabe destacar también, que para mejorar la eficacia en la detección de *Salmonella* spp. por PCR en muestras con bajas cantidades, se recomienda un cultivo previo de la muestra en un medio enriquecido, que permita la multiplicación de la bacteria hasta lograr cantidades próximas a los 10^3 o 10^4 células/ml de caldo (Malorny y Hoorfar, 2005). Además, la utilización de un medio de cultivo líquido previo a la PCR puede también incrementar la eficacia diagnóstica debido a la dilución de los inhibidores presentes en muestras clínicas. Entre los medios más utilizados están el caldo Cerebro Corazón, caldo Tetrionato, caldo Rappaport-Vassiliadis y caldo Selenito-Cisteína (Stone y col., 1994). Esto puede verse en un trabajo norteamericano en el que evaluaron la sensibilidad y especificidad de la PCR para detectar *Salmonella* spp. en carne de pollo, donde encontraron que ninguna muestra fue positiva a la prueba directa y necesitaron de un mínimo de 8 h de pre-cultivo antes de poder detectar la bacteria (Myint y col., 2006).

Sin duda, la principal desventaja del diagnóstico de salmonellas por PCR es la imposibilidad de realizar una caracterización completa de la cepa en estudio. Si bien se han propuesto algunas técnicas moleculares (Wise y col., 2009), la identificación y clasificación de las cepas en serovariedades se realiza según la presencia de antígenos de superficie, detectados a partir de anticuerpos específicos en pruebas de aglutinación. Naturalmente, para esto es necesario contar con la bacteria completa y en altas concentraciones (Caffer y col., 2008). Lo mismo ocurre cuando se desea conocer el grado de sensibilidad a determinados antimicrobianos (Arguello y col., 2013), cuando se realizan estudios epidemiológicos moleculares en casos de brotes o para el seguimiento de rutas de transmisión, que brindan información significativa para la

implementación de planes estratégicos de control en granja, así como para el diseño de planes regionales y/o nacionales (Aarestrup y col., 2007).

De lo planteado en estas líneas, podemos comprender la necesidad de contar con un protocolo de diagnóstico que sea sensible, eficaz y rápido en la detección de *Salmonella* spp. en matrices complejas como la materia fecal de cerdos.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I

Desarrollo de un protocolo rápido y eficaz para la detección de *Salmonella* spp. en materia fecal de cerdo.

a) Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de materia fecal de cerdos en edad de faena por medio de distintos protocolos de trabajo que comprendan métodos de aislamiento bacteriológico y PCR usando cebadores específicos.

b) Evaluar un protocolo rápido y eficaz para la detección de animales que excretan *Salmonella* en sus heces.

c) Comparar la sensibilidad y especificidad de los diversos protocolos diagnósticos evaluados.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

Se trabajó con 40 muestras de materia fecal (MF) de cerdos de un establecimiento de ciclo completo con 1700 cerdas madre, con antecedentes clínicos y diagnóstico de salmonelosis. Las muestras fueron tomadas directamente del recto, por estimulación, colocadas en bolsas plásticas individuales y luego refrigeradas entre 4 y 8 °C hasta su procesamiento dentro de las 48 h posteriores a su obtención.

2. Aislamiento Bacteriológico

a) Pre-enriquecimiento no selectivo

Las muestras de MF (10 g) fueron sembradas en un recipiente conteniendo 100 ml de agua peptonada tamponada (APT) estéril (dilución 1:10), que fue previamente atemperada a temperatura ambiente (22-25°C). Los recipientes fueron incubados durante un total de 18 ± 2 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en una estufa de cultivo con atmósfera aeróbica. Luego de la incubación, se extrajo 1 ml de cada cultivo y se colocó en tubos estériles, los que fueron congelados a -20°C .

Luego de finalizar la siembra, se realizaron controles negativos y positivos que fueron procesados en forma paralela con las muestras. Como control negativo, los medios de cultivo permanecieron no inoculados, pero los frascos fueron abiertos y expuestos al ambiente por el tiempo que se tardaría en sembrar una muestra. Como control positivo, se utilizó una cepa de *S. Typhimurium* aislada de cerdo que fue serotipificada por el INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

b) Enriquecimiento selectivo

Una alícuota de 100 µl de cada cultivo de APT fue transferida a un tubo con 9,9 ml 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 h a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en una

estufa de cultivo con atmósfera aeróbica. Se tomó una alícuota de 1 ml de cada cultivo en RV a las 4, 8 y 24 h de incubación, se transfirieron a tubos estériles y se congelaron a -20 °C para su posterior análisis por PCR.

c) Siembra en placas de agar selectivo

De cada tubo con caldo RV cultivado se sembró, en agotamiento por estrías, una placa de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) utilizando un ansa de 10 µl. El cultivo de las placas se hizo en una estufa a 37°C ± 1°C por 24 ± 2 h en atmósfera aeróbica.

d) Lectura de placas

La lectura de placas de XLD se realizó teniendo en cuenta el color de las colonias que crecen en su superficie. El género *Salmonella* se diferencia por formar colonias negras o rojas con un centro negro, debido a la producción de sulfuro de hidrógeno, a partir del hierro presente en el medio.

e) 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). Cada prueba fue procesada según métodos estandarizados (Caffer y col., 2008). Se consideró positivo a *Salmonella* spp. a las siguientes reacciones: TSI: + K/A con o sin gas; Urea: -; LIA: + K/K.

3. Serotipificación de aislamientos

Las cepas de *S. enterica* 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.

4. PCR

a) Extracción de ADN

Todas las muestras en tubos (APT, RV4h, RV8h y RV24h) fueron llevadas a temperatura ambiente, para luego homogeneizarlas y dejarlas reposar por algunos minutos para lograr decantar los residuos más grandes y extraer el sobrenadante, con el que se trabajó. Para disminuir el efecto de los inhibidores de la PCR presentes en las muestras clínicas y los medios de cultivo selectivos, como las sales biliares, se realizaron 2 lavados consecutivos con buffer TE (Tris 100 mM: EDTA 100 mM) según Trevanich *y col.* (2010). Para esto, cada muestra fue centrifugada a 14.000 rpm (18.630 g) por 3 min, se eliminó el sobrenadante y se le agregó 100 µl de buffer TE, para luego realizar una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Por último, se eliminó el sobrenadante y se agregó 100 µl de buffer TE, el que fue hervido por 5 min para constituir el templado a utilizar en la PCR.

b) Reacción de PCR

La amplificación del gen *invA* se realizó utilizando las condiciones descritas por Malorny *y col.* (2003a), con algunas modificaciones. La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 25 µl, con 5 µl de templado, 1,5 mM de MgCl₂ (50 mM), 200 µM de cada dNTPs (Invitrogen™, CA, USA), 1 U de Taq ADN polimerasa (5 UI/µl) (Invitrogen™, CA, USA), 1X buffer PCR (Invitrogen™, CA, USA), 0,4 µM de cada cebador (F139, R141) (Tabla 1), 0,4% (P/V) de albúmina sérica bovina (BSA) y 300 copias del control interno de reacción (IAC) (Malorny *y col.*, 2003a). En cada batería de reacciones se agregaron controles positivos (*S. Typhimurium*) y negativos (mezcla sin inocular).

Tabla 1: Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del gen *invA* de *Salmonella* spp.

Gen	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del fragmento (pb)
<i>invA</i>	F 139	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	284
	R 141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	

c) Ciclado

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene Gradient (Labnet, NJ, USA) con las siguientes condiciones de incubación: una desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, seguido de 38 ciclos de 95°C por 30 s, 64°C por 30 s y 72°C por 30 s. Por último, se utilizó un periodo de extensión final a 72°C por 4 min.

d) 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 1 µl de bromuro de etidio a la solución tibia, que luego fue colocada en el soporte, armado con su respectivo peine.

e) 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 5 µl de la muestra y 1 µl de buffer de siembra. Cada 10 muestras se sembró un control positivo y un control negativo, seguido del marcador de peso molecular (100 pb ladder, Invitrogen™, CA, USA).

La corrida electroforética para cada gel se realizó a 130 volt por 30 min.

f) 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 (1 µg/ml) formando bandas coloreadas que se observaron a través de un transiluminador de luz UV (Cole Palmer).

El fragmento *invA* posee un tamaño de 285 pb, por lo que se consideró positiva toda muestra donde se observó una banda aproximada a este peso molecular, y que coincidía con la amplificada en el control positivo. A su vez, se consideró negativa a toda muestra donde hubo amplificación del IAC (157 pb), pero no se evidenció banda del tamaño del gen buscado. Las muestras donde no hubo amplificación del IAC y no presentaban bandas compatibles con el fragmento buscado o se observaba el ADN “chorreado”, fueron consideradas como “degradado”.

5. Análisis Estadístico

Se calculó la sensibilidad relativa de cada uno de los métodos de detección considerando el número de muestras positivas a ese método, dividido por el número total de muestras positivas al menos a uno de los 4 métodos probados. Además, se utilizó el paquete estadístico *Stata* 11 (StataCorp, Texas, USA) para comparar los resultados obtenidos por cada método con la bacteriología, que se consideró como prueba de oro, considerando solo los resultados positivos o negativos. Las posibles diferencias entre proporciones de muestras positivas a cada método fueron analizadas con el test de McNemar, con un nivel de significancia estadística de $p < 0,05$. También se calculó la Sensibilidad, Especificidad, el Valor Predictivo Positivo (VPP), el Valor Predictivo Negativo (VPN) para cada método.

Por último, para evaluar el grado de acuerdo entre los diferentes métodos y el cultivo bacteriológico estandarizado (ISO 6579/02), se calcularon los valores de kappa y sus respectivos intervalos de confianza (95%) para cada uno (*Stata 11*). La interpretación de los valores de kappa se realizó según Landis y Koch (1977): ≤ 0 , pobre acuerdo; 0,01 – 0,20, acuerdo leve; 0,21 – 0,40, acuerdo bajo; 0,41 – 0,60, acuerdo moderado; 0,61 – 0,80, acuerdo alto; 0,81 – 1,00 acuerdo casi perfecto.

D. RESULTADOS

En solo 3 muestras de MF se logró aislar *S. enterica* con el protocolo bacteriológico utilizado (Tabla 2). Los aislamientos fueron clasificados como *S. Livingstone* (muestra 11 y 21) y *S. Panama* (muestra 37). Todas las reacciones, excepto una, con templados preparados a partir de una alícuota del pre-enriquecimiento (APT) fueron clasificadas como “degradadas” por no presentar amplificación alguna, ni siquiera del IAC (Figura 1). Del total de muestras de RV analizadas por PCR, hubo amplificación del IAC en el 72% de las reacciones, con el 28% restante de reacciones “degradadas” (Tabla 2). No hubo muestras positivas en APT, mientras que 7, 3 y 3 muestras fueron positivas al PCR a las 4, 8 y 24 h de cultivo en RV, respectivamente (Tabla 2).

La PCR de RV a las 4 h de cultivo fue la prueba con mayor sensibilidad relativa, seguida por el PCR RV 8 y 24 h, y el cultivo bacteriológico que presentaron la misma sensibilidad relativa (Tabla 3). Además, fue el único de los métodos de PCR que mostró diferencias en la Especificidad y el VPP con respecto a la bacteriología (Tabla 4).

El test de McNemar se obtuvo un $p = 0,125$ en la PCR a las 4 h, y un valor de $p = 1$ en las PCR a las 8 y 24 h. Los valores de kappa (κ) que estiman el grado de acuerdo entre los métodos de PCR con la bacteriología (prueba de oro) fueron 0,5436 (95% IC 0,1347 - 0,8091), 1 (95% IC 0,4734 - 1.0000) y 1 (95% IC 0,5072 - 1.0000) para la PCR a las 4, 8 y 24 h, respectivamente

Tabla 2: Resultado de las 40 muestras de materia fecal procesadas por PCR en el medio de pre-enriquecimiento (APT), en el segundo paso de cultivo (RV) en 3 tiempos diferentes y al protocolo de cultivo bacteriológico completo.

Muestra	PCR				Análisis Bacteriológico
	APT 24h	RV 4h	RV 8h	RV 24h	
1	Degradado	Positivo	Degradado	Negativo	Negativo
2	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
3	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
4	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
5	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
7	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
8	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Degradado	Degradado	Degradado	Degradado	Negativo
11	Degradado	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
12	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
13	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Degradado	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
16	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
17	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Degradado	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Degradado	Negativo	Negativo	Degradado	Negativo
21	Degradado	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
22	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
24	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
25	Degradado	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29	Degradado	Degradado	Degradado	Degradado	Negativo
30	Degradado	Degradado	Degradado	Degradado	Negativo
31	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
32	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
34	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
35	Degradado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	Degradado	Negativo	Degradado	Negativo	Negativo
37	Degradado	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
38	Degradado	Degradado	Degradado	Degradado	Negativo
39	Degradado	Degradado	Degradado	Degradado	Negativo
40	Degradado	Degradado	Degradado	Degradado	Negativo

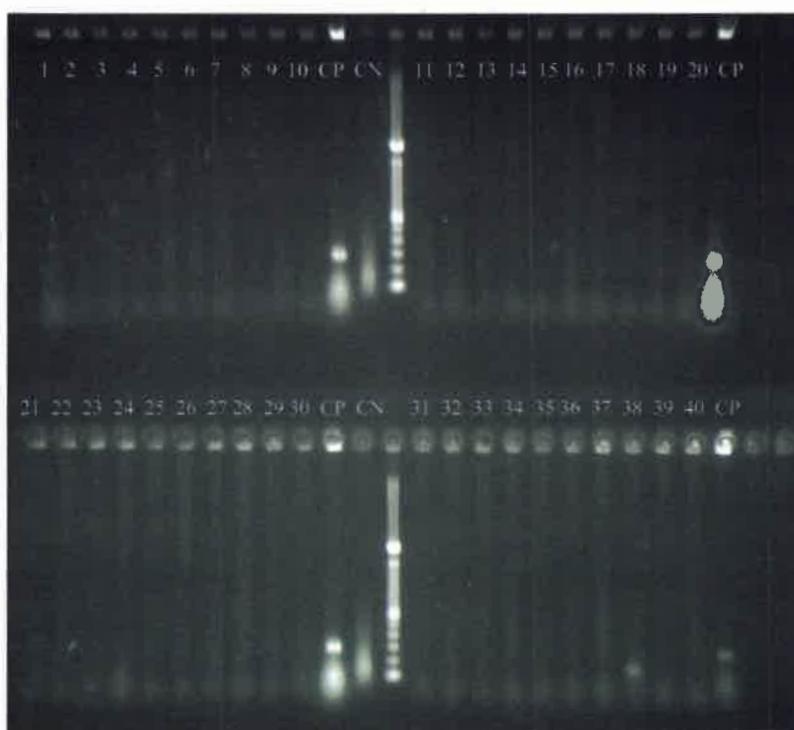


Figura 1: PCR de materia fecal con 24 h de cultivo en APT. Se observan las muestras (1 al 40), en el centro el marcador de peso molecular, controles positivos (CP) y controles negativos (CN).

Tabla 3: Sensibilidad relativa de la PCR en los diferentes pasos y tiempos de cultivo, y del protocolo bacteriológico completo.

Método	Nº muestras positivas	Sensibilidad Relativa (%)
PCR APT	0	0
PCR RV 4h	7	100
PCR RV 8h	3	43
PCR RV 24h	3	43
Bacteriología	3	43
TOTAL	7	100

Tabla 4: Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la PCR a partir del medio de pre-enriquecimiento (APT) y del enriquecimiento (RV) en 3 tiempos de cultivo, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. Entre paréntesis los intervalos de confianza al 95%.

	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
PCR APT 24h	-	-	-	-
PCR RV 4h	100%(29,2-100)	87,1% (70,2-96,4)	42,9% (9,9-81,6)	100% (87,2-100)
PCR RV 8h	100%(29,2-100)	100% (79,4-100)	100%(29,2-100)	100% (79,4-100)
PCR RV 24h	100%(29,2- 100)	100% (88,4 - 100)	100%(29,2- 100)	100% (88,4 - 100)

E. DISCUSIÓN

1. Diagnóstico de *Salmonella* spp.

La presentación de enfermedades de curso subclínico dentro de una piara constituye uno de los principales problemas sanitarios que afectan y desmejoran los índices productivos de una explotación porcina. A esto debe sumarse el riesgo para la salud pública que implica el consumo de animales infectados en caso de enfermedades zoonóticas. La detección de cerdos portadores o con infecciones por *Salmonella* spp. de curso subclínico y que excretaban bajas cantidades de bacterias en las heces, requiere de técnicas con alta sensibilidad y especificidad, que tengan baja probabilidad de resultados falsos negativos. Además, la disminución de los tiempos necesarios para el diagnóstico reviste gran importancia, ya que permitiría tomar medidas correctivas en forma precoz y efectiva.

Una de las debilidades de los resultados obtenidos en el presente trabajo radicaría en la baja cantidad de muestras analizadas, que podrían impactar sobre la precisión de los cálculos estadísticos. Sin embargo, un número similar de muestras ha sido utilizado en diversos trabajos para evaluar la eficacia diagnóstica de las técnicas aquí probadas. Por ejemplo, Jensen *y col.* (2013), utilizó 30 muestras de heces bovinas contaminadas artificialmente con *S. Dublin*, para evaluar el grado de acuerdo entre la bacteriología y el qPCR.

Otro de los factores que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados es que se trabajó con muestras de campo, donde se desconoce la concentración de microorganismos, lo que sumado a la utilización de técnicas cualitativas, no nos permite aseverar sí el número de bacterias presentes pudo haber influenciado en los resultados obtenidos por cada una.

El protocolo bacteriológico aplicado para el cultivo de heces, permitió detectar *Salmonella* en el 7,5% de los cerdos muestreados. Este porcentaje es similar al 6,2% promedio de prevalencia de cerdos que excretaban *Salmonella* en heces reportado por Fosse y col. (2009), en una revisión de 46 estudios de 15 países de Europa y América del Norte; y al 6,4% encontrado por Pires y col. (2013), en un seguimiento de la población de cerdos de una granja durante 3 años. Aunque, en este último trabajo se reportó que el porcentaje de cerdos que excretaban *Salmonella* en heces disminuyó considerablemente alrededor de las 20 semanas de vida hasta niveles cercanos al 1%.

2. Sensibilidad Relativa

La sensibilidad relativa del protocolo bacteriológico (43%), fue similar al 45% encontrado por Eriksson y Aspan (2007), con el mismo protocolo al analizar 102 muestras de materia fecal de cerdo, aunque, en ese caso las muestras habían sido contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de *Salmonella*. Valores similares han sido reportados por De Busser y col. (2013), en un trabajo donde analizaron muestras de contenido duodenal de 458 cerdos faenados (56%); y por Funk y col. (2000) en pruebas con 10 g de materia fecal de 153 cerdos (52,6%). La leve diferencia en la sensibilidad relativa de la técnica en este trabajo puede deberse al bajo número de muestras analizadas en relación a esos otros estudios, así como a la diferencias entre las matrices analizadas y a que los autores compararon sólo protocolos bacteriológicos entre sí.

Es de destacar la relativa baja sensibilidad que parece tener la bacteriología para la detección de *Salmonella* en materia fecal. Para De Busser y col. (2013) la sensibilidad relativa de la bacteriología puede incrementarse a valores cercanos al 80% si el enriquecimiento selectivo se realiza con medios semi-sólidos, como el Rappaport-Vassiliadis semi-sólido modificado, en vez de utilizar caldos. No obstante, los mismos autores advierten que la capacidad de migración de *Salmonella* puede disminuir cerca

del 30% cuando la bacteria se encuentra en bajas concentraciones (10^3 ufc/ml) en el pre-enriquecimiento, por lo que podría ser fácilmente perdida con los protocolos de cultivo que incluyen medios semi-sólidos. Esto sin duda afecta la detección de animales con bajas cargas de *Salmonella* en heces.

Al analizar la eficacia de la PCR, se puede evidenciar lo planteado por Davies *y col.* (2000), Beggesen *y col.* (2007) y Kuyuncu y Haggblom (2009) sobre la dificultad de esta técnica para el diagnóstico de patógenos en una matriz compleja como la materia fecal. El 100% de las reacciones con templados preparados a partir de una alícuota del pre-enriquecimiento (APT) no presentó amplificación de fragmento de ADN alguno, ni siquiera del IAC. Mientras que un segundo y consecutivo cultivo en RV como sustrato para la PCR mostró un mejor desempeño, ya que se logró amplificar exitosamente el CIR en el 72% de las reacciones. Esto difiere con Trevanich *y col.* (2010) quienes proponen que un solo pre-cultivo por al menos 14 h en un medio no selectivo es suficiente para detectar diferentes serovariedades de *S. enterica* por técnicas basadas en PCR, con el mismo protocolo de extracción de ADN utilizado en este trabajo. Las diferencias podrían relacionarse a que en aquel trabajo se utilizaron muestras de carne de pollo contaminada artificialmente con cepas activadas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, que han sido asociadas con extensos mecanismos de adaptación y supervivencia (Spector y Kenyon, 2012).

La sensibilidad relativa de los distintos protocolos de PCR varió principalmente en estadios tempranos del cultivo, donde a pesar que fue incapaz de detectar *Salmonella* spp. en las alícuotas de APT, tuvo la mayor sensibilidad relativa de todas las pruebas (100%), tan solo 4 h después de que las muestras pasaran del APT al RV. La gran cantidad de reacciones “degradadas” entre las muestras de APT pueden deberse a la presencia de inhibidores de reacción de la materia fecal, así como a una alta concentración de ADN dentro del templado (Wilson, 1997). Luego, como explica Stone

y col. (1994), los inhibidores y el ADN presentes en altas concentraciones en el pre-enriquecimiento, podrían diluirse cuando este medio es transferido al RV en una dilución de 1:100, lo que mejoraría las reacciones. A esto se suma lo planteado por Malorny y Hoorfan (2005) sobre la utilidad del cultivo selectivo para incrementar el número de *Salmonella* presentes por encima de las 10^3 o 10^4 células por ml de caldo, lo que posibilitaría la detección por PCR.

En un trabajo realizado en Irlanda, donde se comparó el cultivo bacteriológico y la detección del gen *invA* por PCR, usando protocolos muy similares al corriente trabajo, para detectar *Salmonella* spp. en subproductos de cerdo que se utilizan como obsequios para mascotas. En dicho trabajo, la PCR también mostró mayor sensibilidad, detectando 4% más de muestras positivas que la detección bacteriológica (Adley y col., 2011).

A diferencia de estos resultados, la utilización de pre-cultivos para la detección de *Salmonella* spp. en materia fecal mediante el uso de técnicas basadas en PCR no fue efectiva para Jensen y col. en 2013. Los autores reportaron que la qPCR usada para la detección de *Salmonella* spp. en heces naturalmente contaminadas tuvo un desempeño muy pobre, lo que atribuyeron a la complejidad de la matriz y a que la bacteria podría encontrarse en baja concentración en dichas muestras. Una de las posibles explicaciones de estas diferencias es que a pesar de haber utilizado kit comerciales para la extracción de ADN y un IAC, las reacciones de PCR se hicieron a partir de alícuotas del pre-cultivo no selectivo (APT), tal como ocurrió en el presente trabajo donde no fue posible detectar la bacteria en estas condiciones.

Si bien, como ya fue mencionado, Trevanich y col. (2010) asegura que un pre-cultivo de un solo paso es suficiente para mejorar la eficacia de detección de *Salmonella*, según nuestros resultados, sumado a las dificultades encontradas por Myint y col. (2006) y Jensen y col. (2013), se puede pensar que un segundo pre-cultivo selectivo es necesario para mejorarla eficacia de la PCR para la detección de *Salmonella* en heces. Esto

coincide con lo planteado por Taskila y col. (2012) luego de revisar ampliamente el efecto de los medios de enriquecimiento en la detección de *Salmonella* en alimentos, donde los autores concluyeron en resaltar que los procedimientos más confiables para la detección de *Salmonella* son los que utilizan enriquecimientos en dos pasos consecutivos, que incluyen una recuperación en medios no selectivos y un cultivo selectivo en condiciones más astringentes. No obstante, algunos ajustes sobre las condiciones de reacción podrían lograr disminuir el efecto de los inhibidores presentes en la materia fecal, ya sea con el uso de facilitadores de reacción o con la cuantificación de ADN, que podrían disminuir las reacciones “degradadas” y aumentar la sensibilidad en el PCR a partir del pre-cultivo.

No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los protocolos de PCR y la bacteriología. No obstante, de las 7 muestras que fueron positivas al PCR con 4 h de cultivo en RV, y que le dieron una sensibilidad relativa perfecta a este protocolo, 4 fueron clasificadas como negativas por el resto de los protocolos de PCR y la bacteriología (con excepción de la muestra 1 al PCR de RV 8 h, que resultó degradado). Una de las explicaciones que ha sido planteada por diferentes autores, es que la PCR a las pocas horas de que las muestras fueran pasadas a un medio de enriquecimiento pudo detectar la presencia de bacterias injuriadas, que luego no pudieron adaptarse y sobrevivir en las condiciones de cultivo selectivo, y por eso no fueron detectadas en las pruebas sucesivas (Rijpens y col., 1999; Myint y col., 2006; Taskila y col., 2012). La relativa baja virulencia, en cuanto a su capacidad de adaptación, que se puede esperar en las serovariedades aisladas puede ser otra de las causas de la no supervivencia de estas cepas en algunas muestras. Las variaciones individuales en la composición de la microbiota intestinal también ha sido recientemente asociadas a la posibilidad de supervivencia y crecimiento de *Salmonella* a niveles que permita su detección, sobre

todo en cerdos con bajas concentraciones de la bacteria en heces, como es frecuente en casos de infecciones subclínicas (Bearson *y col.*, 2013).

3. Sensibilidad y Especificidad

Al comparar la PCR con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia, se observa que la primera posee una muy alta sensibilidad, igual al valor de referencia, y que por lo tanto, el principal problema son los “falsos positivos”, que afectarían la especificidad y el VPP de la técnica. Esto coincide con lo observado en un estudio sueco, en el que compararon varios protocolos de cultivo bacteriológico con el uso de ELISA y PCR para la detección de *Salmonella* spp. en heces de diferentes especies. Los autores remarcaron que el principal problema de los métodos basados en PCR radica en la dificultad para poder confirmar algunos resultados positivos mediante la bacteriología, debido a la presencia de bacterias estresadas, serotipos de cultivo dificultoso, o directamente, a falsos positivos que pueden aparecer en las técnicas basadas en PCR (Eriksson *y Aspan*, 2007).

Para Myint *y col.* (2006), la especificidad de la PCR para la detección de *Salmonella* spp. fue perfecta (100%) e independiente del protocolo de pre-cultivo utilizado, aunque si observó variabilidad en la sensibilidad de la misma (83%), debido a los falsos negativos que relacionó a la presencia de inhibidores de reacción. La diferencia con los valores de la PCR en RV a las 4 h de cultivo del presente trabajo, puede relacionarse a que los autores trabajaron con una matriz diferente como es la carne de pollo, con otros inhibidores, pero también a que la PCR se realizó luego del pre-enriquecimiento en APT y de 24 h de cultivo selectivo en RV o Tetracionato. Como ya se vio, esto podría impactar sobre la especificidad de la técnica por la no detección de bacterias injuriadas.

Los resultados de la PCR del cultivo en RV por 8 y 24 h fueron iguales a los del cultivo bacteriológico. Tanto la sensibilidad, como la especificidad, el VPP y el VPN tuvieron valores idénticos para estos tres protocolos de detección molecular de

Salmonella. Además, estos dos protocolos de PCR (8 y 24 h en RV) tuvieron un valor máximo de acuerdo con la prueba de referencia, representado por un valor de kappa igual a 1, que según Landis y Koch (1977) representa un acuerdo perfecto. Según estos mismos autores, el nivel de acuerdo del protocolo de PCR del cultivo en RV por 4 h fue moderado, con un kappa igual a 0,5436 (95% IC 0,1347 - 0,8091), aunque si tenemos en cuenta el intervalo de confianza, el valor de kappa podría ingresar en la misma categoría de los otros protocolos de PCR analizados (0,8-1 = acuerdo casi perfecto). Los resultados son semejantes a los niveles de acuerdo encontrados por Myint y col. (2006), quienes reportaron un kappa de 0,84 para la comparación de la PCR con el doble cultivo APT-RV y de 1 cuando se utilizó Tetracionato como medio selectivo.

De lo anterior, y coincidiendo con Wilkins y col. (2010) se puede pensar que la PCR de los medios de enriquecimiento selectivo puede ser una herramienta útil como prueba tamiz en la detección de *Salmonella* spp. en heces de forma efectiva en tiempo y costos, metodología que ha sido comprobada en estudios anteriores (Prendergast y col. 2009). Según los resultados obtenidos, sería necesario un mínimo de 12-18 h de pre-enriquecimiento y al menos 8 h de enriquecimiento selectivo para lograr identificar las muestras que posibilitarían un aislamiento efectivo de la bacteria. Por otro lado, si el objetivo fuera identificar todos aquellos animales que excretan *Salmonella* en sus heces, es posible incrementar la sensibilidad relativa de la técnica mediante un protocolo precoz utilizando muestras tras 4 h de enriquecimiento, que facilitaría la detección de bacterias injuriadas en la muestra.

El dilema primordial de la detección de *Salmonella* en heces mediante PCR es lograr establecer y estandarizar protocolos de pre-cultivo, extracción de ADN y uso de facilitadores de reacción que maximicen la efectividad de la técnica. Si bien existen kit comerciales de extracción de ADN para materia fecal de comprobada efectividad en la remoción de inhibidores y purificación de ADN (Malorny y Hoorfar, 2005), estos suelen

incrementar mucho los costos, sobre todo cuando se deben analizar un gran número de muestras, como las que son frecuentemente necesaria para detectar enfermedades que se presentan con baja prevalencia, por ejemplo, los animales subclínicos que excretan *Salmonella* en heces. Por esto, es necesario que estos protocolos sean baratos y no muy complejos para poder extender y facilitar la aplicación en los laboratorios de diagnóstico.

Queda clara la necesidad de profundizar y extender también las investigaciones sobre protocolos que combinen métodos de cultivo y de biología molecular, que permitan no solo detectar los patógenos en materia fecal, sino también la individualización de la bacteria para poder lograr una caracterización más específica de la misma (serovariedad, patrón de sensibilidad antimicrobianos, perfil genético), necesario para implementar medidas estratégicas de control.

Por otra parte, otro de los aspectos interesantes a ahondar es en el establecimiento de métodos que permitan detectar, diferenciar y cuantificar bacterias vivas, injuriadas y muertas. Esto reviste importancia ya que la caracterización de las poblaciones patógenas presentes en una muestra puede ayudar a comprender la epidemiología de cada caso en particular, además de disminuir los riesgos de transmisión.

A pesar de comprobar lo planteado por Funk (2003) y Wilkins *y col.* (2010) sobre las “imperfecciones” que tienen los protocolos de cultivo bacteriológico para el aislamiento de *Salmonella* spp. en materia fecal, queda claro que por el momento no se han establecido métodos moleculares confiables y reproducibles que tomen su lugar como prueba de oro. Un largo camino queda por recorrer en este sentido, y la bacteriología goza de buena salud.

CAPITULO II

PREVALENCIA DE GRANJAS INFECTADAS Y SEROVARIEDADES DE *SALMONELLA ENTERICA* PRESENTES EN CERDOS EN LA ARGENTINA

A. INTRODUCCIÓN

1. Producción porcina en la Argentina

La cadena de la carne porcina argentina ha experimentado un crecimiento importante en los últimos 10 años. Según el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), esto se relaciona con una serie de políticas monetarias y económicas que mejoraron la rentabilidad del sector, y enfrentaron un escenario favorable por las posibilidades de aumentar el consumo interno y sustituir importaciones, lo cual se tradujo en un incremento de la producción nacional (Iglesias y Ghezan, 2013). Esto se ve claramente en los datos de faena porcina reportados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación (MAGPyA), donde en 2003 se registró uno de los valores más bajos en la producción de cerdo, con una faena de 158.310 toneladas de res con hueso, y luego de 10 años de crecimiento sostenido, ese valor fue superado en el primer semestre de 2013 donde se registraron 191.671 toneladas de res con hueso, por lo que se espera duplicar en este año lo producido en 2003 (MAGPyA, 2013). Además, el consumo de carne de cerdo entre el 2000 y 2010 aumentó a una tasa de crecimiento anual acumulada de 0,36%, pasando de 7,83 kg a 8,12 kg/habitante/año (Iglesias y Ghezan, 2013), llegando en el primer semestre de 2013 a los 10,01 kg/habitante/año (MAGPyA, 2013).

Según el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), en la actualidad existen registrados 68.695 establecimientos porcinos (SIGSA, 2013). Sin embargo, la concentración de la faena porcina en el país es alta, ya que los 20 establecimientos más grandes participan en más del 80% de la faena, y los primeros diez lo hacen en un 65% (Moreno y Telechea, 2011). Esto se explica por el hecho que el 96% de los establecimientos tiene menos de 50 madres, y se clasifican en lo que INTA define como “producción de subsistencia”, seguido de otro gran número de “criaderos comerciales” que tienen entre 51 y 200 cerdas madre en producciones semi-intensivas.

Finalmente, el volumen de producción de carne de cerdo para el consumo está dado por lo que INTA llama “empresas de producción porcina”, que son las granjas de más de 200 cerdas madre, con personal en relación de dependencia afectado en forma directa y permanente a la actividad, y que tienen una producción planificada e integradas verticalmente en la cadena productiva (INTA, 2004). En 2012, estas últimas fueron estimadas a nivel nacional por el Sistema Integrado de Gestión Sanitaria en Sanidad Animal (SIGSA) en tan solo 322 granjas, la mayoría de las cuales está concentradas en la región central del país (datos del SIGSA provistos por la Dirección Nacional de Sanidad Animal – SENASA).

Según el Plan Estratégico Agroalimentario Argentina 2020, en los próximos años se espera un crecimiento sostenido de la cadena porcina nacional. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre algunas enfermedades que podrían afectar no solo a la producción de cerdos, sino también representar un riesgo para los consumidores de esos productos por tratarse de enfermedades de transmisión alimentaria.

2. *Salmonella* en la producción de cerdo

La creciente aparición de infecciones clínicas y sobre todo subclínicas por *Salmonella* spp. en la producción porcina mundial, sumado a la importancia de los subproductos del cerdo como intermediario en la transmisión de este patógeno al hombre y a la alta asociación estadística encontrada por diferentes autores entre la prevalencia en 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 más notorios son los que se llevan a cabo en Suecia (Carlsson y Elvander, 2012), Noruega (Sandberg y col., 2002; Hofshagen y col., 2008), Dinamarca (Mousing y col., 1997; Møgelmoose y col., 2000; Alban y col., 2002; Alban y col., 2012), Reino Unido (Clough y col., 2009) y Alemania (Merle y col., 2011).

En los últimos 10 años, el establecimiento de programas de control regionales de *Salmonella* en granjas, cómo el fijado por la Unión Europea (UE) a partir de la Directiva Europea 2003/99, la Regulación -EC- N°2160/2003 y la Regulación -EC- N°668/2006, dio lugar a la aparición de una gran diversidad de trabajos de investigación para determinar las situaciones particulares de países o regiones geográficas, que aportaron datos epidemiológicos importantes para el diseño e implementación de nuevos planes de control, o el fortalecimiento de los ya existentes (Alban y col., 2002; Sandberg y col., 2002; Weiss y col., 2002; Bahnson y col., 2006; García-Feliz y col., 2007; Hofshagen y col., 2008; Clough y col., 2009; Dorn-in y col., 2009; Silva y col., 2009; Cardinale y col., 2010; Kich y col., 2011; Merle y col., 2011; Methner y col., 2011; Visscher y col., 2011; Alban y col., 2012; Arguello y col., 2013; Ward y col., 2013).

Según el monitoreo realizado por la *European Food Safety Authority* (EFSA) en 2006-2007, los países escandinavos Suecia, Noruega y Finlandia son los que presentan menor prevalencia de *Salmonella* en cerdos de toda la producción porcina europea, con niveles por debajo del 1,3% de los porcinos faenados (EFSA, 2008). Esto fue posible gracias a los extensivos programas de vigilancia en los sistemas productivos, combinado con estrictas medidas de control en granjas (Sandberg y col., 2002; Hofshagen y col., 2008). En Suecia, durante el 2012 el 0,03% de los cerdos faenado fue positivo a *Salmonella* spp., con tan solo 2 granjas denunciadas. Las serovariedades recuperadas durante los programas de vigilancia fueron *S. Typhimurium*, *S. Derby* y *S. Infantis* (Carlsson y Elvander, 2012).

Otro de los países de avanzada en el tema es Dinamarca, que en 1995 fue de los primeros en incorporar planes de control de *Salmonella* en su producción porcina (Mousing y col., 1997). A pesar de esto, la prevalencia de granjas casi se triplicó entre el 14% reportado por Christensen y col. (1998), y el relevamiento realizado por la EFSA en 2008 donde lograron aislar *Salmonella* spp. en el 40,9% de 298 granjas analizadas.



Además, en este último estudio, *S. Derby* fue la más difundida en el 34,4% de las granjas, seguida de *S. Typhimurium* (31,1%) y *S. Infantis* (18,9%) (EFSA, 2009; Arguello *y col.*, 2013). Estos resultados llevaron a que en 2010 se hiciera un cambio de estrategia en el plan de control danés (Alban *y col.*, 2012).

Inglaterra incorporó en el 2002 un programa de monitoreo de *Salmonella* en cerdos que estaba basado en el modelo danés (BPEX, 2002). Sin embargo, según la EFSA, en 2008 el 52,2% de los plantales reproductores fue positivo a *Salmonella* spp. (EFSA, 2009), con una concentración espacial de las granjas positivas a *Salmonella* en determinadas regiones geográficas del país, que fue luego reportada por Clough *y col.* (2009).

En España, uno de los principales productores de cerdo de Europa, García-Feliz *y col.* en 2007, tras realizar un estudio bacteriológico de cerdos en edad de faena de 232 granjas de engorde y de ciclo completo, reportaron que pudo aislar *Salmonella* spp. en 100 (43,1%). Además, *S. Typhimurium* estuvo presente en el 38% de los casos, superando a *S. Rissen* (25%) y *S. Derby* (14%).

Methner *y col.* (2011) realizaron un monitoreo en frigoríficos de Alemania, donde encontraron que el 13,8% de 1830 cerdos faenados fue positivo a *Salmonella* spp., con preponderancia de *S. Typhimurium* (47,8%), *S. Derby* (36,9%), *S. Infantis* (6,4%) y *S. Enteritidis* (5%). Resultados similares fueron reportados ese mismo año por otro grupo de investigadores que hicieron un seguimiento de 4 sistemas productivos y encontraron que el 13,2% de los cerdos faenados fueron positivos a *Salmonella* spp., aunque en el muestreo realizado en la granja el porcentaje de cerdos que excretaron la bacteria en heces fue del 5,65%. Además, encontraron una mayor diversidad de serotipos en cerdos faenados (21 variedades) que en las granjas (15) donde *S. Typhimurium* y *S. Derby* fueron las más aisladas (Visscher *y col.*, 2011).

Fuera de Europa, en la isla de la Reunión, territorio francés de ultramar, Cardinale y col. (2010) encontró que en el 40% de las 60 granjas estudiadas lograron aislar *Salmonella* spp. de al menos un cerdo de terminación, siendo *S. Typhimurium* la serovariedad más frecuentemente aislada con el 40%, seguida de *S. Derby* (12%). Otro territorio insular relevado fue Australia, donde Ward y col. en 2013 encontraron que el 31,3% de los cerdos salvajes del noroeste de ese país tuvo algún tipo de *Salmonella* en sus heces. Aunque en este caso, las principales serovariedades encontrada fueron *S. Anatum* (20,9%) y *S. Saintpaul* (9,4%). En Tailandia, Dorn-in y col. en 2009 trabajaron con 22 granjas y encontraron que todas las granjas fueron positivas a *Salmonella* spp., donde *S. Rissen* (56%), *S. Stanley* (16%) y *S. Typhimurium* (10%) fueron las más frecuentemente aisladas. En China la principal serovariedad aislada en animales de consumo fue *S. Derby* (Li y col., 2013), mientras que *S. Rissen*, *S. Typhimurium*, *S. London* y *S. Panama* fueron las más frecuentemente aisladas en cerdos en Korea (Kim y col., 2012).

Dentro del continente americano, uno de los reportes más antiguos en Estado Unidos fue el de Carlson y col. (2001) quienes analizaron los ganglios mesentéricos de 3442 cerdos en faena, que pertenecían a 25 granjas de Minnesota. Los autores encontraron *Salmonella* spp. en el 64% de las granjas e identificaron 18 serovariedades, entre ellas las más comunes fueron *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Newhaw*, *S. Typhimurium* y *S. Mbandaka*. Algunos años después, Bahanson y col. (2006) utilizaron una metodología muy similar, incrementaron el tamaño de la muestra a un total de 146 rodeos y detectaron 100 (68,5%) con al menos 1 ganglio positivo a *Salmonella*. De las 33 serovariedades aisladas, la más frecuente fueron *S. Derby* (23,2%), *S. Typhimurium* (17,1%), *S. Brandenburg* (10,5%), *S. Uganda* (5,7%) y *S. Anatum* (4,8%).

Otros datos de América del Norte fueron aportados por Rajic y col. (2005) donde trabajaron con muestras de materia fecal y ambientales de 90 granjas de Alberta, Canadá.

Los autores encontraron que el 66% de las granjas tuvo al menos un aislamiento de *Salmonella* spp. con predominio de *S. Typhimurium* aislada del 22,4% de las granjas, seguida de *S. Derby* (22%) y *S. Infantis* (14,6%). Un estudio posterior de Farzan y col. (2006) encontraron *Salmonella* en las heces de cerdos del 26,8% de las 41 granjas analizadas, que correspondían a 12 serovariedades con un preponderancia de *S. Typhimurium* que se encontró en el 45% de las granjas.

A nivel regional, la mayoría de los informes de situación conocidos se encuentran en Brasil, donde por ejemplo, Weiss y col. (2002) relevaron muestras de *pooles* de materia fecal del piso de corrales en 10 establecimientos porcinos en el estado de Río Grande do Sul y encontraron *Salmonella* en 3 granjas. *Salmonella* Bredeney y *S. Panama* fueron aisladas de 2 granjas, y *S. Derby* fue la única serovariedad en una. Algunos años después, da Silva y col. (2009) analizaron 300 muestras de ganglios mesentéricos de cerdos faenados en el estado de Mato Grosso. Los autores reportaron aislamientos de *Salmonella* en el 16,6% de los animales, donde el 16% fueron clasificadas como *S. Derby* y el 14% como *S. Typhimurium*. Bessa y col. (2004) y Schwarz y col. (2009) trabajaron en frigoríficos de Río Grande do Sul, donde encontraron que *S. Typhimurium* fue la serovariedad más prevalente entre los cerdos en faena. En el estado de Santa Catalina, Kich y col. (2011) muestrearon 178 cerdos en la última etapa de engorde en 12 rodeos y hallaron *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Panama* y *S. Houtenae* en el 49% de las heces analizadas.

Otros informes hallados en Sudamérica, incluyen a Colombia donde Rincón y col. (2008) realizaron un monitoreo en frigorífico y encontraron 37,8% de las carcasas de cerdos fue positiva a *Salmonella*, cuyo 47% fue caracterizada como *S. Typhimurium*, seguida de *S. Derby* (14%) y *S. Agona* (10%). En Chile, Villamil y col. (2012) lograron recuperar *Salmonella* en la materia fecal de 12 de 29 compañías de producción porcina, y reportaron a *S. Infantis* y *S. Typhimurium* como las más frecuentemente aisladas.

En Argentina existe poca información estadística con respecto a la presencia de *Salmonella* en la producción porcina. Los datos se limitan a casos individuales, aislamientos de alimentos o reportes institucionales, como los del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” quienes como centro de referencia en enfermedades infecciosas en humanos, reciben también algunos aislamientos relacionados a brotes de salmonelosis. Según algunas publicaciones de los investigadores de este organismo, históricamente las serovariedades más frecuentemente aisladas en animales de producción fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* y *S. Dublin*, con variaciones de acuerdo a la especie animal (Caffer y col., 2007), aunque desde 2006, *S. Typhimurium* se convirtió en la serovariedad más frecuentemente identificada en muestras de humanos, animales y alimentos (Caffer y col., 2010).

Con respecto específicamente al cerdo, Ibar y col. (2009), a partir de un muestreo de contenido de colon y ganglios mesentéricos de cerdos faenados en cuatro frigoríficos de Argentina, reportaron a *S. Schwarzengrund* y *S. Heidelberg* como las más frecuentemente aisladas, con una prevalencia de cerdos infectados por *Salmonella* del 21,2%. Otro informe conocido es el de Vigo y col. (2009) donde reportaron aislamientos de *S. Bovismorbificans* y *S. Muenster* en muestras de materia fecal de cerdos de una granja porcina de múltiples sitios de la zona central del país. Un aporte reciente puede tomarse de Favier y col. (2013) que lograron recuperar *S. Anatum* en muestras de subproductos de carne de cerdo en San Luís. En Parada y col. (2013), lograron aislar *S. Derby* de cerdos en engorde en una granja de 6400 cerdas madre con cuadros subclínicos de salmonelosis. Además, en cerdos faenados de esta granja reportaron las serovariedades *S. Schwarzengrund*, *S. Bredeney*, *S. Saintpaul* y *S. Derby* como las más frecuentemente aisladas.

3. Salmonelosis en la granja

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 y Alexander, 2001). Según Johansen y col. (2010), en un estudio observacional de cerdos entre 12 y 19 semanas, encontraron que los animales que presentaron diarrea durante el periodo de estudio ganaron 118 gramos menos por día que los cerdos sin diarrea.

Recientemente, se ha demostrado también, la existencia de una dinámica particular en la microbiota intestinal del cerdo durante infecciones por *Salmonella entérica*. Se observó que la introducción de este patógeno dentro del ambiente digestivo alteró la maduración y composición normal de la microbiota intestinal, en forma independiente a si el animal presentó un cuadro clínico (diarrea) o subclínico de la enfermedad. La modificación de las diferentes poblaciones que componen normalmente la microbiota intestinal podría significar una afectación de los parámetros productivos de los cerdos infectados, así como predisponer a nuevas infecciones (Bearson y col., 2013). Esto deja claro la importancia que tienen los cuadros entéricos subclínicos dentro de la producción, por generar grandes pérdidas económicas en forma silenciosa.

La cantidad de cerdos afectados en casos de salmonelosis en una granja, suele ser muy variable y dependiente de diversos factores, como la serovariedad de *S. enterica* presente, la sanidad de los cerdos, el tamaño de la granja y el manejo de los animales,

entre otros (Funk y Gebreyes, 2004; García-Feliz y col., 2009; Alban y col., 2012). Según Sanchez y col. (2007) en un trabajo de revisión sistemática y meta-análisis de 98 artículos de publicados entre 1990 y 2005, que correspondían a estudios en 23 países de importante producción de cerdos en América, Europa y Asia, la media general de granjas positivas a *Salmonella* fue del 59%, con una media de cerdos infectados por granja de 17%. Para Fosse y col. (2009), en otro meta-análisis, esta vez de 46 estudios en 15 países de América del Norte y Europa, la prevalencia media de cerdos infectados por *Salmonella* en una piara fue del 21,8%, con un promedio de 6,2% de cerdos que excretaban la bacteria en sus heces.

Pires y col. (2012) realizaron un estudio longitudinal sobre el patrón de excreción de *Salmonella* en heces de cerdos en engorde naturalmente infectados, donde encontraron que el 15,1% de los cerdos evaluados tuvieron diarrea al menos una vez entre las 10 y 24 semanas de vida. Aunque, sólo lograron recuperar *Salmonella* en el 6,4% de las muestras de materia fecal, con un tiempo medio de excreción en heces de 14 días, y cerdos que excretaron *Salmonella* en forma intermitente durante todo el periodo de estudio. Los autores reportaron también que el pico máximo de excreción de *Salmonella* en heces se dio al comienzo del engorde y disminuyó hacia el final de este periodo. Sin embargo, Rostagno y col. (2012) en un seguimiento de cerdos en edad de faena de 6 granjas, reportaron una prevalencia de cerdos que tenían *Salmonella* en sus heces en los días finales del engorde del 12,9% (95% IC 8,0 – 17,8%), aunque los valores fueron variables entre cohortes.

Con respecto a las características de las granjas, para Zheng y col. (2007) no hay relación entre el sistema de producción (granjas orgánicas vs granjas confinadas vs granjas al aire libre) y la prevalencia de *Salmonella* en la piara. Aunque, según García-Feliz y col. (2009) sí existe una asociación estadística directa entre el número de cerdos faenados por año, con la prevalencia de cerdos que excretaban *Salmonella* en heces en

esas granjas, ya que los autores encontraron que granjas con más de 3500 cerdos faenados por año fueron los rodeos con mayor cantidad relativa de aislamientos de *Salmonella* en España. Para Hautekiet y col. (2008) el número de cerdas en producción también constituye uno de los factores de riesgo asociados a la mayor seroprevalencia de *Salmonella* en cerdos de Bélgica, aunque también destaca la importancia de las condiciones de alojamiento de los animales (temperatura en la sala y el espacio asignado por animal en engorde), la rigurosidad de las medidas de higiene y el manejo de las instalaciones y de los animales.

Las piaras pueden ser infectadas por una gran diversidad de serovariedades de *Salmonella entérica* que nos son específicas del cerdo, tal es así, que según Sanchez y col. (2007) las variedades más frecuentemente aisladas en granjas de cerdos en los países de mayor producción porcina mundial, son habitualmente *S. Typhimurium* y *S. Derby*. Con la característica que suelen encontrarse en forma única dentro de cada piara (Arguello y col., 2013), aunque, en ocasiones también se puede encontrar más de una serovariedad en una granja, e inclusive, según De Busser y col. (2013), también en un mismo animal.

De todo lo anterior, se ve la importancia de conocer la situación actual de las infecciones por *Salmonella* en la producción porcina argentina, información que puede marcar una línea basal desde donde evaluar la necesidad de implementación de planes de vigilancia y/o control de *Salmonella* en la producción porcina nacional, y posibilitar también, el conocer cuáles pueden ser los patrones de diseminación de los diferentes subtipos de las cepas patógenas para cerdos.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO II

Prevalencia de granjas infectadas y serovariedades de *Salmonella enterica* presentes en cerdos en la Argentina

- d) Determinar la prevalencia de granjas cuyos cerdos en edad de faena excretan *Salmonella* spp. en sus heces, en el área de mayor producción porcina de Argentina.
- e) Establecer la frecuencia de presentación de las diferentes serovariedades de *S. enterica* en cerdos en edad de faena.
- f) Evaluar la diversidad genética de los aislamientos de diferentes serovariedades de *S. enterica* identificados en cerdos en el país.
- g) Analizar la distribución geográfica de las diferentes cepas identificadas.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población y Muestras

Para determinar las serovariedades de *S. enterica* de mayor frecuencia de presentación en cerdos de la República Argentina, se utilizaron datos del SIGSA, provistos por la Dirección Nacional de Sanidad Animal – SENASA. Se tuvieron en cuenta las granjas confinadas que contaban con más de 200 cerdas madre, es decir, se relevaron sólo las clasificadas por INTA como “empresas porcinas” (INTA, 2004). Según el SIGSA, en 2012 este tipo de granjas acumulaban un total de 153.350 cerdas madre, donde el 85% de estas reproductoras se encontraban concentradas en la zona central del país, comprendida por Córdoba, Buenos Aires, Entre Ríos, San Luís y Santa Fe (Figura 2). En estas provincias, se registraron 278 granjas confinadas de ciclo completo y de más de 200 cerdas madre cada una, lo que representa el 78% de las granjas de ese tipo en todo el país. Estas granjas constituyen los sistemas productivos más importantes del país, y por lo tanto, la población sobre la que se pretende inferir la prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella*.

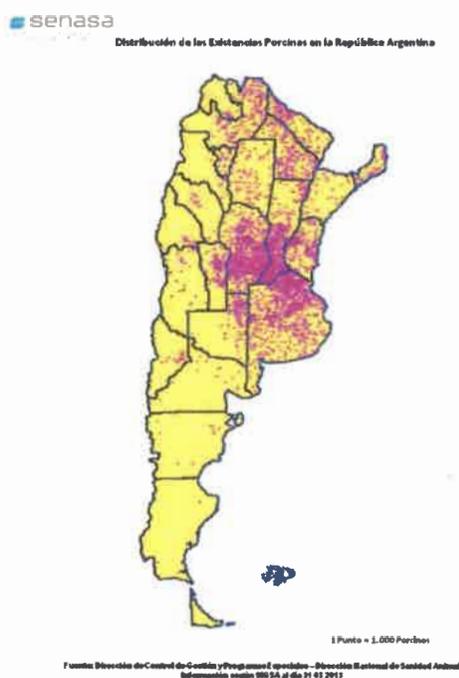


Figura 2: Distribución de la existencia porcina en la Argentina (SIGSA, 2013).

Para determinar la frecuencia de presentación de *S. enterica*, se tuvo en cuenta los resultados obtenidos por Sanchez y col. (2007). El cálculo del número de granjas a muestrear necesario para ser representativo de la población general, se consideró una prevalencia esperada de 59%, con el 90% de confianza y una precisión del 10%, utilizando la fórmula para prevalencia según Thrusfield (2007):

$$n = \frac{Z^2 P_{\text{esp}} (1-P_{\text{esp}})}{d^2} \implies n = \frac{1,96^2 0,59 (1-0,59)}{0,1^2} \implies n = 65$$

Dónde: P_{esp} = prevalencia esperada

d = precisión

El número de granjas necesario inferencial en poblaciones infinitas, fue ajustado teniendo en cuenta el número de granjas confinadas de más de 200 madres reportadas por el SIGSA (2012), según Thrusfield (2007):

$$n_{\text{aju}} = \frac{N \times n}{N + n} \implies n_{\text{aju}} = \frac{278 \times 65}{278 + 65} \implies n_{\text{aju}} = 52$$

Dónde: N = población en estudio

n = tamaño de muestra

La selección de las 52 granjas se realizó mediante un muestreo no probabilístico intencionado, considerando las granjas más grandes de la región, y se completó con granjas cuyos productores aceptaron participar del estudio, y que cumplieran con las condiciones establecidas: granjas confinadas de ciclo completo, con más de 200 cerdas madre.

En cada granja, se tomaron muestras de materia fecal de animales de 22 semanas de vida. El número de muestras fue el necesario para detectar al menos un cerdo que excretara *Salmonella* en sus heces (presencia/ausencia). Esto permitió identificar a cada granja como positiva o negativa para *Salmonella* spp. El cálculo se realizó mediante la fórmula para presencia-ausencia según Thrusfield (2007):

$$n = (1 - (1 - p_1)^{1/d}) (N - d/2) + 1 \implies n = (1 - (1 - 0,95)^{1/8}) (100 - 8/2) + 1$$

$$\implies n = 30$$

Dónde: p_1 = probabilidad de encontrar al menos un caso

N = tamaño de la población

d = número mínimo de animales infectados

Cada granja fue muestreada una sola vez y se identificó con un sistema de código único para asegurar la confidencialidad de los datos durante el análisis y publicación de los resultados.

a) Muestreo dentro de la granja

Dentro de cada granja se realizó un muestreo dirigido de cerdos en terminación con alrededor de 22 ± 1 semanas de vida. En caso que existiera más de un galpón con cerdos de esta edad, el número total de muestras ($n = 30$) fue dividido por la cantidad de galpones, para tomar un número equivalente de muestras en cada uno. La toma de muestra de materia fecal en cada galpón con cerdos de esta edad, se realizó priorizando aquellos animales que presentaran heces blandas (diarrea) y tomando como máximo 3 - 4 cerdos por corral (muestreo dirigido).

Cada muestra representa un cerdo, del cual se extrajeron aproximadamente 20 g (puñado chico) de materia fecal directamente del recto, por estimulación rectal o durante la defecación. Las muestras fueron tomadas en bolsas plásticas nuevas (rollo de bolsas) utilizando guantes de látex. En general, se evitó la toma de muestras del suelo. Una vez finalizado el muestreo, las materias fecales fueron colocadas en conservadoras y refrigeradas entre 4 y 8°C utilizando conservantes en cantidad necesaria, para luego ser remitidas a los laboratorios de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, donde se realizaron las pruebas de laboratorio.

2. Aislamiento Bacteriológico

Las muestras de MF se analizaron por aislamiento bacteriológico mediante un protocolo de estándares internacionales ISO 6579/02, considerado como “prueba de oro” en la detección de *Salmonella* spp. Todas las muestras fueron procesadas dentro de las 48 h posteriores a su obtención.

a) Pre-enriquecimiento no selectivo

Las muestras de MF (10 g) fueron sembradas en un recipiente conteniendo 100 ml de agua peptonada tamponada (APT) estéril (dilución 1:10), que fue previamente atemperada a temperatura ambiente (22-25°C). Los recipientes fueron incubados durante un total de 18 ± 2 h a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en una estufa de cultivo con atmósfera aeróbica.

Luego de finalizar la siembra, se realizaron controles negativos y positivos que fueron procesados en forma paralela con las muestras. Como control negativo, los medios de cultivo permanecieron no inoculados, pero los frascos fueron abiertos y expuestos al ambiente por el tiempo que se tardaría en sembrar una muestra. Como control positivo, se utilizó una cepa de *S. Bredeney* aislada de cerdo que fue serotificada por el INEI - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

b) Enriquecimiento selectivo

Una alícuota de 100 µl de APT fue transferida a un tubo con 9,9 ml 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 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en una estufa de cultivo con atmósfera aeróbica.

c) Siembra en placas de agar selectivo

De cada tubo con caldo RV cultivado se sembró, en agotamiento por estrías, una placa de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) utilizando un ansa de 10 µl. El cultivo de las placas se hizo en una estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 h en atmósfera aeróbica.

d) Lectura de placas

La lectura de placas de XLD se realizó teniendo en cuenta el color de las colonias que crecen en su superficie. El género *Salmonella* se diferencia por formar colonias negras o rojas con un centro negro, debido a la producción de sulfuro de hidrógeno, a partir del hierro presente en el medio

e) Subcultivo de colonias sospechosas

En cada placa sospechosa, una colonia fue transferida a un medio sólido selectivo para Enterobacterias, agar Mc Conkey, para su aislamiento y purificación. En 10 granjas positivas, de una misma muestra dos colonias fueron repicadas de diferentes zonas de la placa y fueron seguidas como aislamientos diferentes (X^a y X^b), para evaluar la presencia de más de una serovariedad de *S. enterica* en la muestra.

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). Cada prueba fue procesada según métodos estandarizados (Caffer y col., 2008). Se consideró positivo a *Salmonella* spp. a las siguientes reacciones: TSI: + K/A con o sin gas; Urea: -; LIA: + K/K.

3. Reacción de PCR

Todos los aislamientos de MF con bioquímicas compatibles, fueron confirmados como *Salmonella* spp. mediante la detección del gen *invA* por PCR, siguiendo la metodología descrita en el CAPÍTULO I (C.4), con algunas modificaciones.

a) Re-aislamiento de colonias sospechosas

Dos colonias fueron levantadas de la placa de cultivo purificado (agar McConkey) y resembradas en placas de agar Muller Hilton o TSA para evitar los inhibidores de la PCR presentes en el agar selectivo.

b) Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislamientos sospechosos se realizó directamente dentro del termociclador MultiGene Gradient (Labnet, NJ, USA), mediante la modificación de la fase inicial de desnaturalización del ADN a 95°C, que inicialmente era por 1 min y se extendió a 5 min. Esto permite lograr la lisis bacteriana y la liberación del ADN dentro de la mezcla de reactivos. Para evitar la inhibición de la reacción de PCR por los residuos de pared de la bacteria, se agregó 0,4% (P/V) de BSA.

c) Ciclado

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene Gradient (Labnet, NJ, USA) con las siguientes condiciones de incubación: una desnaturalización inicial a 95°C por un 5 min, seguido de 38 ciclos de 95°C por 30 s, 64°C por 30 s y 72°C por 30 s. Por último, se utilizó un periodo de extensión final a 72°C por 4 min.

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.

La 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 H1, HA, HB y HC, 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.

5. Subtipificación genética de cepas

Se trabajó con todas las cepas recuperadas de muestras de MF de cerdos que pertenecían a las serovariedades de *S. enterica* que tienen importancia clínica en la salud porcina y humana, como son *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Infantis* y *S. Heidelberg*, entre otras.

El estudio se realizó en los laboratorios del Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “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 *et al.*, 2006) con la enzima *XbaI* (Invitrogen™, CA, USA).

a) 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 en atmósfera aeróbica a 37°C por 18 h.

b) Preparación de bloques de agarosa

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

c) Lisis celular

Los bloques de agarosa fueron colocados en tubos de polipropileno y sumergidos en Buffer de lisis (TE 50 mM, pH 8,0, 1% laurilsarcosina) con 25 µl de solución de Proteinasa K (20 mg/ml). Los tubos se incubaron en baño termostático con agitación vigorosa (200 rpm) a 55°C por 2 h.

d) Lavado de bloques de agarosa

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

e) Digestión del ADN

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

f) Preparación del gel de agarosa

Los bloques de agarosa 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 0,5 X. Los bloques de la cepa patrón *S. Braenderup* H9812 fueron sembrados en las calles 1, 5, 10 y 15 respetando el protocolo de PulseNet.

g) Electroforesis

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

Tiempo de pulso inicial A: 2,2 s.

Tiempo de pulso final A: 63,8 s.

Voltaje: 200 V (6 volts/cm).

Tiempo de corrida: 20 h.

h) Tinción y documentación del gel

Una vez finalizada la corrida de electroforesis el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 30 min. Posteriormente el gel fue enjuagado en agua destilada por 60 - 90 min, 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 Math) aplicando los parámetros establecidos para la Red PulseNet Internacional (optimización 1.5% y porcentaje de tolerancia en la posición de las bandas 1.5%, coeficiente de Dice y método UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - para la construcción de dendrogramas).

i) Comparación de pulsotipos

La relación entre los pulsotipos de una misma serovariedad se analizó según el número de bandas diferentes entre los perfiles, siguiendo las recomendaciones de Tonover y col. (1995), de la siguiente manera:

Perfiles idénticos	sin bandas diferentes
Estrechamente relacionados	≤ 2 bandas diferentes
Posiblemente relacionados	≤ 4 bandas diferentes
Diferentes	≥ 5 bandas diferentes

Los aislamientos fueron clasificados dentro del mismo *cluster* cuando se agruparon en una misma rama del dendrograma y presentaron perfiles de PFGE con 4 o menos bandas de diferencia para *S. Typhimurium* y 6 o menos bandas de diferencia para *S. Derby*.

D. RESULTADOS

1. Granjas Muestreadas

Fueron muestreadas 52 granjas de 7 provincias argentinas (Figura 3). Sólo 3 granjas no cumplieron con el número mínimo de 200 cerdas madre, pero fueron mantenidas en el muestreo por representar zonas que no habían sido muestreadas y respetar las demás condiciones de selección (Tabla 5). Los aislamientos de *Salmonella* de la granja S13 se obtuvieron con anterioridad (2 años) al presente muestreo, pero fueron tenidos en cuenta en el análisis por representar una granja de alta producción. El total de las granjas muestreadas equivalen a 48.780 cerdas madre, lo que representa una fracción de muestreo del 31,8% de la población total de las granjas de este tipo. En 22 granjas de 6 provincias se logró recuperar al menos un aislamiento de *Salmonella* spp. (Figura 3), lo que da una prevalencia de granjas positivas del 42,3% (95% IC 28,4-56,1%), con una mayor prevalencia en granjas con más de 1001 madres en producción (Figura 4).

Se procesaron 1.518 muestras de materia fecal. Debido a fallas puntuales, se debieron cultivar menos de 30 muestras en 4 de las granjas incluidas, 3 de las cuales fueron clasificadas como positivas (Tabla 5). Se aisló *Salmonella* en 95 muestras de heces, con un promedio en cada granja positiva de 13,6% (95% IC 8,0 – 19,2) cerdos en edad de faena que excretaban la bacteria en heces.



Figura 3: Georeferenciación de las granjas muestreadas, especificando cuales fueron negativas (□-blanco) y positivas (●-gris) para la presencia de *Salmonella* spp.

Tabla 5: Detalle de las 52 granjas muestreadas, indicando código, origen, número de madres, aislamiento bacteriológico, muestras tomadas y porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* spp. en cada granja.

Código	Provincia	N° de madres	Aislamiento Bacteriológico	N° de muestras	N° de muestras +	% Muestras + en cada granja
B1	Buenos Aires	300	Positivo	30	3	10
B11	Buenos Aires	650	Negativo	30		
B12	Buenos Aires	6300	Negativo	30		
B13	Buenos Aires	700	Positivo	30	1	3,3
B14	Buenos Aires	1200	Positivo	30	2	6,6
B15	Buenos Aires	650	Negativo	30		
B16	Buenos Aires	420	Positivo	30	15	50
B17	Buenos Aires	950	Positivo	30	2	6,6
B2	Buenos Aires	214	Negativo	30		
B3	Buenos Aires	650	Positivo	30	15	50
B4	Buenos Aires	330	Negativo	30		
B5	Buenos Aires	280	Negativo	30		
B6	Buenos Aires	370	Positivo	30	2	6,6
B7	Buenos Aires	350	Positivo	30	5	16,6
B8	Buenos Aires	1000	Negativo	30		
B9	Buenos Aires	370	Negativo	30		
C1	Córdoba	521	Positivo	30	9	30
C10	Córdoba	500	Negativo	30		
C11	Córdoba	300	Positivo	30	2	6,6
C12	Córdoba	1250	Negativo	30		
C14	Córdoba	300	Negativo	30		
C15	Córdoba	680	Negativo	30		
C16	Córdoba	500	Negativo	30		
C17	Córdoba	650	Negativo	30		
C18	Córdoba	1000	Negativo	30		
C19	Córdoba	1000	Negativo	30		
C2	Córdoba	1000	Negativo	30		
C20	Córdoba	250	Positivo	30	2	6,6
C21	Córdoba	700	Negativo	30		
C3	Córdoba	300	Positivo	28	6	21,4
C4	Córdoba	300	Negativo	30		
C5	Córdoba	500	Negativo	23		
C6	Córdoba	2500	Positivo	30	3	10
C7	Córdoba	250	Positivo	25	2	8
C8	Córdoba	650	Negativo	30		
C9	Córdoba	500	Negativo	30		
Er1	Entre Ríos	180	Negativo	30		
Lp1	La Pampa	1000	Negativo	30		
M1	Mendoza	115	Positivo	16	1	6,2
Sf1	Santa Fe	2300	Positivo	30	3	10
Sf2	Santa Fe	350	Negativo	30		
Sf3	Santa Fe	200	Positivo	30	1	3,3
Sf4	Santa Fe	3500	Positivo	30	10	33
Sf5	Santa Fe	200	Negativo	30		
Sf6	Santa Fe	500	Negativo	30		
Sf7	Santa Fe	250	Negativo	30		
Sf8	Santa Fe	150	Negativo	30		
Sj1	San Juan	1200	Positivo	30	2	6,6
Sj2	San Juan	1000	Positivo	30	4	13,3
Sl1	San Luis	1750	Positivo	30	2	6,6
Sl2	San Luis	1300	Negativo	30		
Sl3	San Luis	6400	Positivo	16	3	18,8
TOTAL		48.780		1.518	95	13,6%

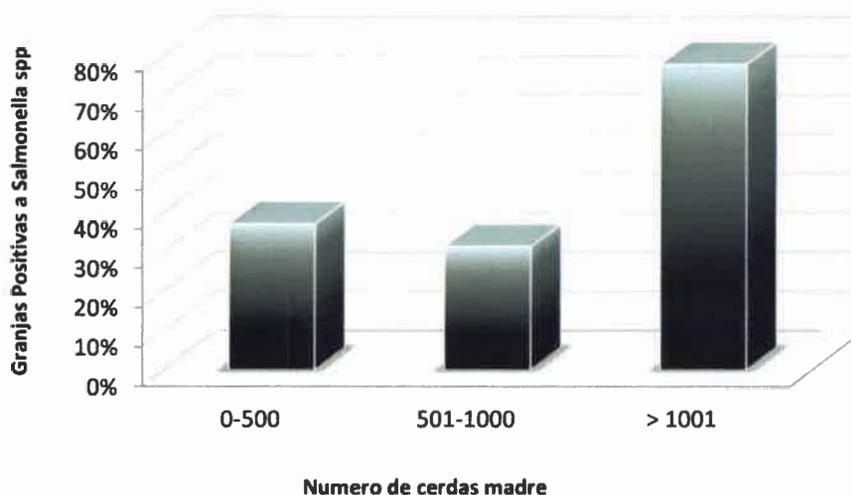


Figura 4: Porcentaje de granjas positivas a *Salmonella* spp. según el número de cerdas madre.

2. Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Salmonella*

Por la disponibilidad de recursos en el laboratorio, se serotipificó un máximo de 5 aislamientos confirmados mediante PCR como *Salmonella* spp. en cada granja positiva, para un total de 53 cepas de las 22 granjas donde se aisló la bacteria. Los aislamientos de 2 granjas no pudieron ser recuperados para su serotipificación, y fueron clasificados como *Salmonella* spp. (Tabla 6). En 8 muestras positivas de diferentes granjas en las que se seleccionó 2 colonias (^a, ^b) de diferentes partes de la placa de cultivo primario (XLD), ambas cepas fueron clasificadas dentro de la misma serovariedad (Tabla 6). Las serovariedades de *S. enterica* más frecuentemente aisladas en los establecimientos porcinos fueron *S. Typhimurium* (8 granjas) y *S. Derby* (6 granjas). *Salmonella Choleraesuis*, la serovariedad más adaptada al cerdo, solo fue aislada en una granja de Córdoba (Figura 5). En el 63% de las granjas positivas sólo se identificó una serovariedad.

Tabla 6: Serotipificación de los aislamientos de *S. enterica* recuperados de materia fecal de cerdos de granjas en Argentina. Se indican los antígenos somáticos y flagelares (en cada una de sus fases) que dieron reacción positiva para cada cepa y la clasificación final según el Esquema de White-Kauffmann-Le Minor.

Cepa	Ag Somático	Ag Flagelar		Serovariedad
		fase 1	fase 2	
B1/7 ^a	A; 3,10,15; 10	B; E; h	H1; 6	<i>S. Anatum</i>
B1/7 ^b	A; 3,10,15; 10	B; E; h	H1; 6	<i>S. Anatum</i>
B1/14	B; 6,7,8; 7	C; r	H1; 5	<i>S. Infantis</i>
B1/18	B; 6,7,8; 7	C; r	H1; 5	<i>S. Infantis</i>
B3/1 ^a	B; 6,7,8; 7	B; G; f		<i>S. Rissen</i>
B3/1 ^b	B; 6,7,8; 7	B; G; f		<i>S. Rissen</i>
B3/10	B; 6,7,8; 7	B; G; f		<i>S. Rissen</i>
B3/18	B; 6,7,8; 7	B; G; f		<i>S. Rissen</i>
B3/24	B; 6,7,8; 7	B; G; f		<i>S. Rissen</i>
B6/3	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
B6/16 ^a	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
B6/16 ^b	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
B7	-	-	-	<i>S. spp.</i>
B13/10 ^a	A; 4,5; 5	C; r	H1; 2	<i>S. Heidelberg</i>
B13/10 ^b	A; 4,5; 5	C; r	H1; 2	<i>S. Heidelberg</i>
B14/8 ^a	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
B14/8 ^b	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
B14/11	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
B16	-	-	-	<i>S. spp.</i>
B17/8	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
B17/30 ^a	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
B17/30 ^b	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
C1/6 ^a	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C1/6 ^b	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C1/16	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C1/22	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C1/27	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C3/2	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
C3/6	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
C3/17	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
C6/X	A; 4,5; 5	C; r	H1; 2	<i>S. Heidelberg</i>
C6/X1	B; 8,7,8; 7	H1; 5	A; c	<i>S. Choleraesuis</i>
C6/X2	A; 4,5	C; L; v	B; E; z15	<i>S. Brandenburg</i>
C7/9	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C7/12	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
C11/15	A; 4,5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
C11/30	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
C20	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
M1/7	B; 6,7,8; 7	B; G; s		<i>S. Montevideo</i>
Sf1/4	B; 6,7,8; 7	B; G; m,t		<i>S. Oranienburg</i>
Sf1/8	B; 6,7,8; 7	B; G; m,t		<i>S. Oranienburg</i>
Sf3/13 ^a	B; 6,7,8; 7	C; L; w	A; d	<i>S. Livingston</i>
Sf3/13 ^b	B; 6,7,8; 7	C; L; w	A; d	<i>S. Livingston</i>
Sf4/2	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
Sf4/8 ^a	A; 3,10,15; 10	B; E; h	H1; 6	<i>S. Anatum</i>
Sf4/8 ^b	A; 3,10,15; 10	B; E; h	H1; 6	<i>S. Anatum</i>
Sf4/18	A; 3,10,15; 10	B; E; h	H1; 6	<i>S. Anatum</i>
Sf4/29	A; 3,10,15; 10	B; E; h	H1; 6	<i>S. Anatum</i>
Sj1/11	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
Sj1/16 ^a	A; 4,5; 5	H1; 2	A; i	<i>S. Typhimurium</i>
Sj1/16 ^b	A; 4,5; 5	H1; 2		<i>S. Typhimurium</i>
Sj2/8	A; 9	C; L; v	H1; 5	<i>S. Panama</i>
Sj2/18	A; 9	H1; 5	C; L; v	<i>S. Panama</i>
Sj2/19	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
Sj2/28	A; 9	C; L; v	H1; 5	<i>S. Panama</i>
SI1/11	B; 6,7,8; 7	C; L; w	A; d	<i>S. Livingston</i>
SI1/21	B; 6,7,8; 7	C; L; w	A; d	<i>S. Livingston</i>
SI3	A; 4,5; 5	A; i	H1; 2	<i>S. Typhimurium</i>
SI3	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>
SI3	A; 4,5	B; G; f		<i>S. Derby</i>

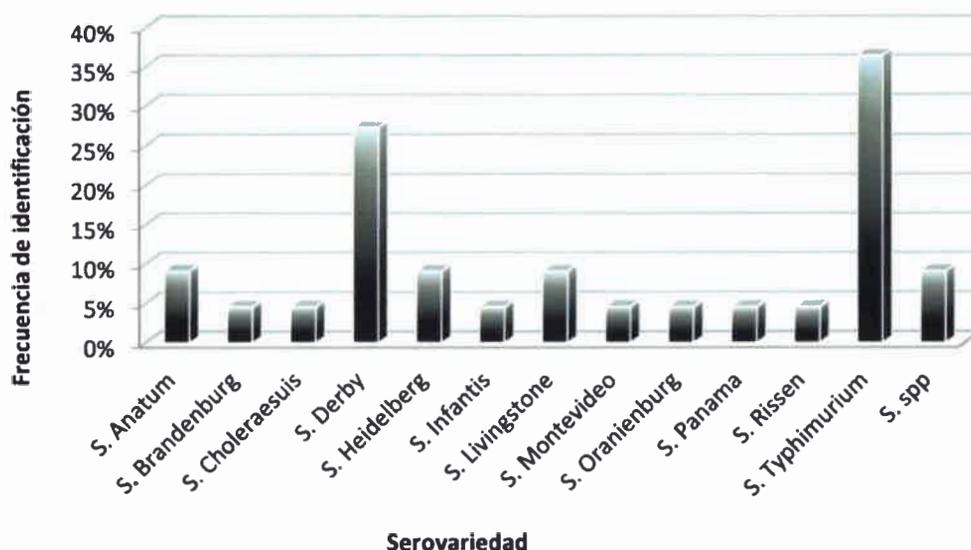


Figura 5: Frecuencia de identificación, en número de granjas, de las serovariedades de *S. enterica* en las 22 granjas positivas.

3. Caracterización genotípica de los aislamientos de *Salmonella*

Se obtuvieron por *Xba*I-PFGE los perfiles de ADN de 34 aislamientos de *S. enterica* que representaban a las ocho serovariedades más importantes para la clínica en cerdos y humanos, entre los que se identificaron 23 pulsotipos (Figura 6). Se pudo evidenciar la presencia de 4 grupos de aislamientos relacionados genéticamente (*clusters*), en cada una de las serovariedades más frecuentemente aisladas (*S. Derby* y *S. Typhimurium*). Los aislamientos de cada *cluster* se agruparon en una misma rama del dendrograma y presentaron perfiles de PFGE con 4 o menos bandas de diferencia para *S. Typhimurium* y 6 o menos bandas para *S. Derby*. En *S. Derby*, el *cluster* A se identificó en el 50% (3) de las granjas donde se aisló esta serovariedad (Figura 7). Mientras que en *S. Typhimurium*, el *cluster* B se encontró en el 62,5% (5) del total de granjas con esta serovariedad, con aislamientos en Buenos Aires, Córdoba y San Juan (Figura 8). Diferentes *clusters* de una misma serovariedad fueron encontrados en las granjas identificadas como: C1 donde se identificaron las variantes A y B de Derby; y Sj1, donde se identificaron las variantes B y C de Typhimurium (Figura 7 y 8).

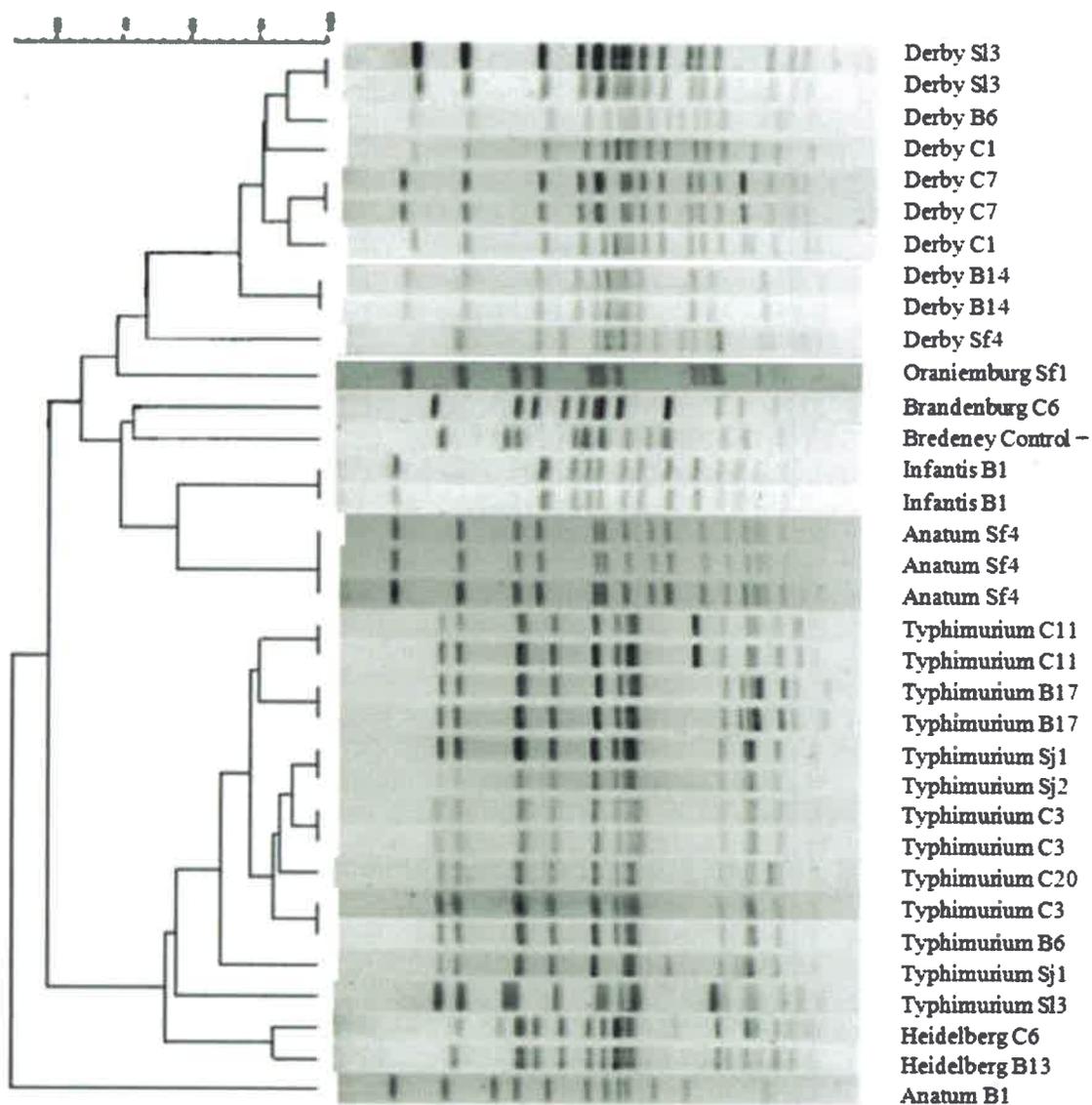


Figura 6: Dendrograma con los perfiles de *XbaI*-PFGE de las principales serovariedades aisladas en materia fecal de cerdos, con su respectiva granja de origen (código).

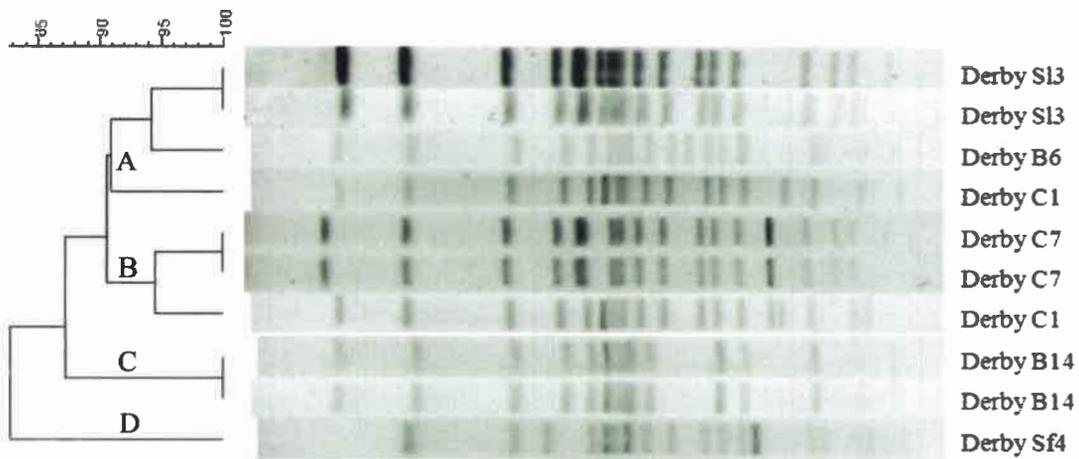


Figura 7: Dendrograma con los perfiles de *XbaI*-PFGE de las cepas de *S. Derby* aisladas en materia fecal de cerdos, con su respectiva granja de origen (código). Con letras (A-D) se destacan los 4 *cluster* encontrados.

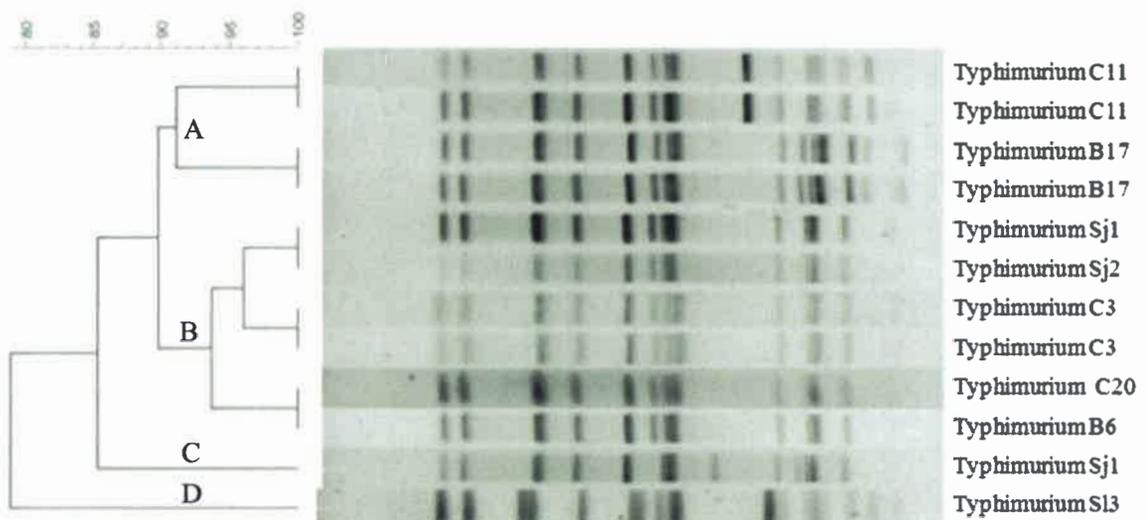


Figura 8: Dendrograma con los perfiles de *XbaI*-PFGE de las cepas de *S. Typhimurium* aisladas en materia fecal de cerdos, con su respectiva granja de origen (código). Con letras (A-D) se destacan los 4 *cluster* encontrados.

E. DISCUSIÓN

1. Importancia del muestreo

El incremento sostenido de la producción porcina nacional, sustentado por el aumento en el consumo de carne fresca y derivados en la población, con mayores expectativas de crecimiento en el corto y mediano plazo, abre grandes expectativas para la producción de cerdos en la Argentina. Sin duda, debe ser un compromiso de productores, veterinarios y otros actores de la cadena de producción el saber acompañar este crecimiento a partir de la mejora en los sistemas productivos, la incorporación de nuevas tecnologías, y la mejora de la nutrición y sanidad de las piaras, a los fines de asegurar no solo un aumento de la cantidad de cerdos producidos, sino principalmente de la calidad de los mismos.

Es en este contexto que el diagnóstico de situación de enfermedades como la salmonelosis parece necesario, no solo por las evidentes pérdidas productivas derivadas de cuadros clínicos o de las más peligrosas cuando se trata de cuadros subclínicos que afectan la producción en forma silenciosa, sino también por tratarse de una enfermedad de transmisión alimentaria de reconocido impacto en la salud pública a nivel mundial.

Con estos argumentos, y considerando la falta de información estadística a nivel nacional sobre la presencia de *Salmonella* en los sistemas de producción de cerdos, se pretendió dimensionar y caracterizar las poblaciones de este patógeno en las piaras del país. Para esto se trabajó con un muestreo que abarcó las principales granjas de cerdos del país y que permitiera inferir sobre el conjunto de granjas que producen más del 85% de la producción nacional de carne de cerdo, que fueron identificadas como granjas de ciclo completo con más de 200 cerdas madre en producción confinada e intensiva.

A diferencia de los principales estudios en Alemania (Methner y col., 2011), Suecia (Carlsson y Elvander, 2012), por la UE en su conjunto (Regulación -EC- N°2160/2003

y la Regulación -EC- N°668/2006; EFSA, 2008), o en Estados Unidos (Carlson *y col.*, 2001; Bahanson *y col.*, 2006b), donde los monitoreos se realizaron a partir de muestras de contenidos intestinales y tejidos tomados durante la faena de los animales, en este estudio se prefirió trabajar con muestras de materia fecal de cerdos tomadas directamente en las granjas donde se producen. A pesar de las dificultades conocidas que tienen los protocolos bacteriológicos para el análisis de materia fecal, que la constituyen en una prueba imperfecta para el diagnóstico (Funk, 2003), se prefirió esta muestra por sobre las tomadas en frigorífico por las dificultades en la contaminación/infección de los cerdos durante el transporte y estadía en el frigorífico, que ha sido claramente establecida por diversos autores como una de las principales formas de contaminación de los cerdos que llegan a faena (Erdman *y col.*, 2003; Vyt *y col.*, 2006; Mannion *y col.*, 2012).

Otro de los factores que se tuvieron en cuenta para desestimar el muestreo en frigorífico, son las características de la cadena de producción y comercialización de cerdos en Argentina, donde tan solo 4 frigoríficos faenan el 55% del total de cabezas producidas en el país (Iglesias y Ghezan, 2013). Con la particularidad histórica que estos mataderos se encuentran agrupados en una pequeña región cercana al puerto de Buenos Aires. La concentración de la faena implica que los cerdos deban recorrer una extensa cantidad de kilómetros desde su granja de origen hasta las plantas de faena, lo que se traduce en tiempos excesivos de transporte, sumado a los periodos en los corrales de espera, y a veces también, a la falta de coordinación entre el frigorífico y el productor para el envío de los animales, da como resultado un mínimo de 8 - 10 h de transporte y estadía pre faena. Estos tiempos son, por ejemplo, ostensiblemente mayores a las 1,7 h promedio de transporte reportadas en Bélgica por Nollet *y col.* (2005), o en Alemania, donde según Visscher *y col.* (2011) los cerdos demoran menos de 3 h promedio desde que abandonaron su granja hasta la línea de faena.

De lo anterior pueden verse las dificultades que pueden aparecer por la aplicación del modelo europeo de monitoreo de *Salmonella* en frigorífico en nuestro país, sobre todo por baja representatividad que puede tener sobre la situación real de las granjas de producción de cerdos en esta región. Esto realza la importancia del muestreo realizado en este trabajo, donde las muestra tomadas, y por lo tanto los aislamientos de *Salmonella* spp. que se obtuvieron, representan directamente a las granjas que producen cerdos en la Argentina.

2. Prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella* en la Argentina: Comparación con datos mundiales.

Extrapolando los resultados obtenidos, se puede decir con un 90% de confianza y una precisión de $\pm 10\%$, que el 42% de las granjas de más de 200 madres de la zona de mayor producción porcina de la Argentina tuvo al menos un cerdo en edad de faena que excretó *Salmonella* spp. en sus heces. Esta prevalencia de granjas positivas es similar a la encontrada por la EFSA durante 2008 en granjas comerciales de Bélgica (36,4%), Dinamarca (41,4%), Francia (38,7%), Irlanda (47,7%), Italia (43,9%), Portugal (43,3%), el Reino Unido (44%), y levemente inferior a la prevalencia en España (53,1%) y Holanda (55,7%) (EFSA, 2009).

La prevalencia de granjas infectadas con *Salmonella* en la Argentina, sí dista mucho, por ejemplo, de los valores encontrados durante 2008 por la EFSA en Suecia, donde sólo el 1,8% de las 57 granjas de reproductores y ninguna de las 150 granjas de engorde fueron positivas a *Salmonella*; o en Noruega donde no hubo aislamientos en las granjas de reproductores (108), ni en las comerciales (143) (EFSA, 2009). Según lo planteado por diversos autores, la baja prevalencia de granjas infectadas en esos países puede estar relacionada a los estrictos programas de control en la producción porcina implementados en esa región nórdica, que incluyen la denuncia obligatoria ante la presencia de casos sospechosos de salmonelosis, medidas de interdicción de granjas positivas hasta que se

logre erradicar nuevamente, compensaciones económicas para las granjas que lo apliquen, y sobre todo, una rigurosa vigilancia epidemiológica de los sistemas productivos. Además, como si fuera poco, estos programas son aplicados en estos países desde hace más de 20 años (Sandberg *y col.*, 2002; Hofshagen *y col.*, 2008; Carlsson *y Elvander*, 2012).

Es importante reconocer también, que la sola presencia de un estricto control en la producción de cerdos, no asegura el éxito de las medidas. El caso de Dinamarca, donde han existido diferentes programa de control de salmonelosis en la producción porcina desde 1995 (Mousing *y col.*, 1997), es una prueba de lo compleja y variable que puede ser la epidemiología de esta enfermedad. Luego de que Christensen *y col.* (1998) reportaran que la prevalencia de granjas danesas positivas a *Salmonella* era del 14%, y pese a todas las medidas de control desde entonces, la EFSA reportó que en 2008 fue posible aislar la bacteria en el 41,4% de las 198 granjas comerciales analizadas en ese país, prevalencia muy similar a la encontrada en Argentina.

Para Alban *y col.* (2012), el incremento de la prevalencia de granjas infectadas en Dinamarca en los últimos años, puede deberse a que las restricciones impuestas en granjas con altos índices de *Salmonella* (según el plan de control danés) fueron insuficientes para limitar la diseminación del patógeno hacia otras granjas. Aunque también se debe destacar que según el monitoreo realizado por la EFSA en 2006-2007, la prevalencia de cerdos en faena infectados con *Salmonella* en Dinamarca fue del 7,7%, representando uno de los valores más bajos entre los principales productores de Europa (EFSA, 2008). Además, según Arguello *y col.* (2013), durante la aplicación del Plan Danés de Control de Salmonella, se logró reducir el número de serovariedades de *S. enterica* recuperadas de cerdos, de 30 detectadas previamente a la implementación, a las 14 identificadas por la EFSA en 2008.

La situación de las granjas porcinas argentinas con respecto a *Salmonella*, parece no distar mucho de lo que ocurre en España, uno de los principales productores de cerdo del mundo, donde García-Feliz *y col.* (2007) lograron aislar *Salmonella* en el 43,1% de las granjas comerciales. Sin embargo, debe considerarse también que los autores trabajaron con muestras de los corrales en esas granjas, lo que puede incrementar los positivos, por detectar algunas cepas ambientales.

Ya en América, la prevalencia argentina parece sensiblemente menor a los reportes encontrados en los Estados Unidos, que se refieren a monitoreos en frigorífico, con aislamientos de *Salmonella* de ganglios mesentéricos ileocecales de cerdos faenados. Primero Carlson *y col.* (2001) con 25 granjas muestreadas en Minnesota, y luego Bahanson *y col.* (2006) quienes adoptaron la misma metodología e incrementaron la cantidad a 113 granjas del centro oeste de ese país, ambos trabajos obtuvieron valores de prevalencia de granjas infectadas con *Salmonella* spp. cercanos al 65%. Aunque, en el segundo estudio las más de 30 serovariedades aisladas en las 73 granjas positivas pueden indicar algún grado de contaminación en frigorífico, sobre todo porque muchas de ellas son frecuentemente encontradas en muestras ambientales en frigorífico.

Quizás resulte más apropiada la comparación con los resultados obtenidos en Canadá por Rajic *y col.* (2005) y Farzan *y col.* (2006), quienes trabajaron con muestras de materia fecal de cerdos y algunas muestras ambientales de los corrales de la granja. A pesar de la cercanía temporal de los estudios, en el trabajo encabezado por Rajic en 90 granjas de Alberta, la prevalencia de 66% de granjas positivas a *Salmonella* spp. fue muy superior a la encontrada por Farzan *y col.* un año después (26,8%). Interesantemente, la prevalencia encontrada en el primer trabajo sí se correspondió regionalmente, consideraciones del muestreo mediante, con valores encontrados en los Estados Unidos en estudios contemporáneos (Bahanson *y col.*, 2006). Sin embargo, de nuevo es difícil establecer la validez de la comparación, ya que la mayoría de los

aislamientos de ambos estudios se dieron en las muestras ambientales que tomaron en los corrales de los animales.

Luego de ubicar los niveles de prevalencia de granjas argentinas positivas a *Salmonella* en el marco de los principales productores mundiales de cerdo, la comparación regional con países de América del Sur parece ser la más adecuada, debido a las similitudes sanitarias, climáticas y productivas existentes. Además, hasta donde se conoce, en ninguno de estos países existe una política establecida para el control de *Salmonella* en los animales de producción, al menos no al nivel de los programa de control existentes en la UE.

En Brasil, uno de los 4 principales productores de cerdo a nivel mundial, se puede tener una idea de la prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella* considerando los resultados reportados por Weiss y col. (2002), donde el 30% de las mismas tuvieron al menos un aislamiento, aunque debe considerarse que fueron relevadas solo 10 granjas. Más recientemente, según Kich y col. (2011) casi 1 de cada 2 muestras de heces de cerdos en edad de faena fue positiva a *Salmonella*, con una importante variabilidad en los perfiles genéticos obtenidos por *XbaI*-PFGE. No obstante, los autores no precisaron si los aislamientos correspondían a heces de cerdos de las 12 granjas estudiadas.

El alto porcentaje (47%) de carcasas de cerdo positivas a *Salmonella* reportado en Colombia por Rincón y col. (2008), comparado con el 16,6% en Brasil (Silva y col., 2009), puede indicar una situación más comprometida en ese país caribeño. Se debe considerar también, que el muestreo de hisopados de la superficie de las canales que se utilizó en ese estudio puede ser más representativo de la higiene durante la faena, que de la prevalencia de animales infectados que llegan a ella. Aunque, es ampliamente aceptado que existe una estrecha relación entre la prevalencia de animales infectados y contaminación de la canal durante la faena, lo que ha sido descrito por diversos autores (Côté y col., 2004; Mcdowell y col., 2007).

El trabajo realizado por Villamil y col. (2012) sugiere una prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella* en Chile del 41,3%, valor muy similar al encontrado en el presente trabajo en la Argentina. En aquel estudio, los autores trabajaron con un gran número de muestras de materia fecal de cerdos (850), utilizaron una metodología similar a la aquí descrita, con la salvedad que el procesamiento fue realizado en pooles de 5 heces cada uno, y monitorearon un número un poco más bajo de granjas (29).

Más allá de algunas diferencias metodológicas y la escasa de información estadística en Sudamérica, al parecer la prevalencia de granjas de cerdos infectadas con *Salmonella* a nivel regional es bastante similar a las reportadas en otras partes del mundo. Sin embargo, la prevalencia de *Salmonella* en cerdos faenados que ha sido reportada en la región, como ser el 47% en Colombia (Rincón y col., 2008), el 71,6% en Brasil (Schwarz y col., 2009) o el 21,2% en Argentina (Ibar y col., 2009), es ostensiblemente mayor al 10,3% (95% IC 9,2-11,5) promedio en toda la UE, que fuera reportado por la autoridad europea como resultado del monitoreo realizado en 2006-2007 (EFSA, 2008).

Esto abre la discusión sobre la necesidad de implementar, al igual que en Europa, algún tipo de estrategia de vigilancia y control, establecidas en forma locales y/o regional, para lograr reducir el riesgo sanitario que implica la alta contaminación con *Salmonella* en la carne de cerdo, sobre todo en una excipiente producción porcina en la región. En este contexto, el conocimiento de la situación epidemiológica y la caracterización de las poblaciones de *Salmonella* que se presentan en los sistemas productivos, pueden representar una ventaja estratégica en el diseño de políticas públicas de control.

3. Caracterización de las granjas cuyos cerdos excretan *Salmonella enterica* en heces en Argentina.

Hasta donde se conoce, este es el primer trabajo que aporta información estadística sobre la presencia y las características de las poblaciones de *Salmonella* que se presentan

en cerdos de granjas comerciales de más de 200 madres en la Argentina. Anteriormente, los antecedentes se limitan a Ibar y col. (2009) que realizaron un monitoreo de cerdos en 4 frigoríficos del país; y Vigo y col. (2009) que evaluaron los patrones de eliminación de *Salmonella* y el tiempo de respuesta serológica de cerdos de una granja con cuadros subclínicos de salmonelosis.

Según Ibar y col. (2009) la prevalencia de cerdos faenados infectados con *Salmonella* en 4 frigoríficos argentinos fue del 21,2%, y las serovariedades Schwarzengrund (27%) y Heidelberg (17%) fueron las más frecuentemente aisladas. Mientras que *S. Derby* y *S. Typhimurium*, las variedades más prevalentes en el presente trabajo, representaron solo el 10% y 7% de los aislamientos, respectivamente. Además, Parada y col. (2013) también reportaron a *S. Schwarzengrund* como la más frecuentemente aislada, esta vez en un solo frigorífico. Como se ve, hay una marcada diferencia entre la prevalencia de serovariedades de *Salmonella* reportadas en frigorífico en esos estudios y las que fueron aisladas en granjas en el presente trabajo, donde, por ejemplo, no se aisló *S. Schwarzengrund*. Como ya fue señalado, esta diferencia entre las serovariedades presentes en granjas y las que pueden aislarse en frigorífico ha sido convenientemente descrita por diversos autores, y relacionada a la contaminación/infección de los cerdos durante el transporte y estadía pre faena (Erdman y col., 2003; Vyt y col., 2006; Magistrali y col., 2008; Mannion y col., 2012).

Es de destacar que, si bien los datos aportados por Ibar y col. (2009) y Parada y col. (2013) parecen ser poco representativos de la prevalencia de serovariedades de *S. enterica* en granjas argentinas, constituyen un gran aporte para el conocimiento de situación en la cadena de producción de cerdo del país, que a la hora de ser evaluada en el marco de futuros programas de control, puede ser complementada con la información que aquí se presenta. Sobre todo considerando que para Sandberg y col. (2002) el éxito

en el plan de control de *Salmonella* en cerdos en Noruega se fundamenta en la vigilancia y control de las granjas, más que de los animales.

Según Clough y col. (2009), las infecciones por *Salmonella* suelen presentar una estructura espacial, con zonas donde el riesgo de infección es mayor, y que por lo tanto, deben ser consideradas en forma particular cuando se planean estrategias de vigilancia y control. En el presente trabajo, en primera instancia parece no haber un patrón espacial definido de granjas positivas a *Salmonella*, ya que las mismas se observan distribuidas por casi toda la zona de mayor concentración de granjas descrita por el SIGSA. Aunque, por otro lado, en el sur de Córdoba puede verse un ligero agrupamiento de granjas (6) donde se logró aislar la bacteria, con el agregado que en casi todas ellas (5) se aisló *S. Typhimurium* o *S. Derby*. Siguiendo lo planteado por Clough y col. (2009), la zona sur de Córdoba podría ser considerada como de mayor riesgo para la infección por *Salmonella*. Sin embargo, el tipo de muestreo por conveniencia utilizado para la selección de granjas, introduce la posibilidad de algún tipo de sesgo en la interpretación.

La particularidad de que la prevalencia de infección con *Salmonella* fue mayor entre las granjas de más de 1001 madres, difiere con los planteado por Van der Wolf y col. (2001) sobre que la granjas pequeñas tienen un riesgo significativamente mayor de poseer cerdos positivos a *Salmonella*, y que este riesgo disminuye a medida que las granjas son más grandes. Según los autores, esto se explicaría porque los grandes sistemas productivos son los que frecuentemente presentan mayores medidas de control sanitarias, como restricciones en el movimiento del personal y de vehículos en el interior del predio, manejo todo adentro/todo afuera, y el control de vectores, como ratas y moscas. Para Lo Fo Wong y col. (2004) el incremento del tamaño de la piara no necesariamente impone un incremento en el riesgo de infección por *Salmonella*, ya que no necesariamente esto implica un incremento de la densidad de cerdos. Además, también destaca que las grandes granjas son las que mayores posibilidades tienen de

aplicar mejores medidas de bioseguridad y buenas prácticas de manejo. Estos argumentos también fueron utilizados por Baptista y col. (2009) para justificar una asociación entre el mayor tamaño de la granjas, con una menor seroprevalencia de *Salmonella*.

Sin embargo, esta relación entre número de madres y riesgo de infección por *Salmonella* ya ha sido descrita por diferentes autores. Por ejemplo, Farzan y col. (2006) encontraron una asociación entre granjas de gran tamaño con un mayor número de cerdos con anticuerpos contra *Salmonella* spp. Para Hautekiet y col. (2008) el incremento en el número de cerdas también tuvo una correlación positiva con la cantidad de cerdos en engorde que fueron seropositivos a *Salmonella* spp. Mientras que según lo encontrado por García-Feliz y col. (2009) en España, el riesgo de hallar cerdos en engorde que excretaran *Salmonella* en sus heces fue mayor en granjas medianas y grandes, que en granjas pequeñas. Resultados similares fueron reportados por Correia-Gomes y col. (2013) en Portugal.

El incremento de las posibilidades de encontrar *Salmonella* en cerdos entre las granjas de mayor tamaño es un factor contradictorio, ya que son estas las que suelen presentar las mayores medidas de bioseguridad e higiene, mejores instalaciones, sumado a la frecuente aplicación de controles sanitarios como antibióticos o vacunas. Sin embargo, también es frecuente que en estas granjas, por el objetivo constante incremento de los índices reproductivos como la fertilidad o la cantidad de nacidos vivos, se tienda a sobrepasar la carga animal tolerada por las instalaciones, sobre todo en la última etapa del engorde. Es bien conocido que el hacinamiento incrementa el contacto directo entre los animales, y entre estos y sus heces, lo que puede favorecer el contagio (Funk y Gebreyes, 2004). A esto se suma el estrés que se genera en los cerdos por competir por el espacio y la comida, condición que disminuye las defensas del animal y lo predispone a nuevas infecciones, o a la reactivación de infecciones latentes (Boyen y col., 2008).

Para Hautekiet y col. (2008), el mayor movimiento de animales (reproductores de reemplazo) y de personal que suele presentarse en granjas de gran tamaño, es una de las posibles explicaciones del incremento del riesgo de hallar cerdos infectados con *Salmonella* en esas granjas. Como se ve, quizás no sea una cuestión de números, sino de mantener un estricto respeto por la bioseguridad y las buenas prácticas de manejo, sobre todo cuando la presión de producción es alta.

Otro resultado a evaluar en las granjas positivas, es el promedio de cerdos en edad de faena que excretaban *Salmonella* en sus heces (13,6%), valor que supera más de dos veces a la prevalencia promedio de eliminadores calculada por Fosse y col. (2009) en un meta-análisis de estudios en América del Norte y Europa, que fue del 6,2%. También contrastan marcadamente con lo encontrado por Pires y col. (2012) en los Estados Unidos, donde lograron aislar *Salmonella* en materia fecal de cerdos durante el engorde en un porcentaje similar al anterior (6,4%), pero además, reportaron que esta proporción disminuía hacia la edad de faena (24 semanas de vida), alcanzando niveles del 0,8%. Sin embargo, debe considerarse que en el presente trabajo se encontró una gran dispersión en el porcentaje de cerdos con *Salmonella* en heces en cada granja positiva (Min= 3,3% - Max= 50%), y que en casi uno de cada dos granjas la media fue del 6,6%, valor muy similar a las medias internacionales.

Por otro lado, Rostagno y col. (2012) encontraron que el 12,9% (95% IC 8,0 – 17,8%) de cerdos en edad de faena tenían *Salmonella* en sus heces. Aunque solo trabajaron con 6 granjas, encontraron una gran variabilidad entre cohortes de animales, lo que se vio reflejado en la dispersión de los intervalos de confianza. Estos antecedentes se asemejan notablemente a los encontrados en el presente trabajo, y proponen una importante presencia de *Salmonella* en cerdos en edad de faena, aunque esto contraste con la disminución en la prevalencia hacia finales del engorde que ha sido planteada por diferentes autores (Pires y col., 2012; Bolton y col., 2013).

Con respecto a las serovariedades aisladas en las granjas infectadas, en la mayor parte de las piaras (63%), solo se aisló una serovariedad de *S. enterica*. Esto es similar a lo descrito por Arguello y col. (2013), quienes a partir de la información recabada por la EFSA en Dinamarca durante 2008, encontraron que en más el 85% de las granjas de reproductores que estaban infectadas con *Salmonella*, los aislamientos de la piara correspondieron a una sola serovariedad.

Las granjas infectadas con más de una serovariedad de *Salmonella entérica* representaron el 27% del total de granjas positivas, con la característica que en dos de cada tres granjas de este tipo se pudo recuperar *S. Typhimurium* o *S. Derby*. Si bien De Busser y col. (2013) describe que es posible encontrar infecciones mixtas por más de una serovariedad en un mismo animal, en el presente trabajo no se pudo encontrar evidencia de ello, ya que en todos los casos donde se repicaron dos colonias de la misma placa de cultivo primario, la serovariedad identificada en ambos aislamientos fue la misma. Sin embargo, sólo fueron 8 las muestras en las que se trabajó por duplicado, y 5 pertenecían a granjas en donde se recuperó una sola serovariedad, lo que disminuye la validez de las interpretaciones que puedan hacerse.

4. Caracterización fenotípica de las poblaciones de *Salmonella* en cerdos en Argentina

Según los resultados obtenidos, se puede decir que *S. Choleraesuis*, la serovariedad más adaptada al cerdo, es poco prevalente entre las granjas de producción porcina argentina, ya que sólo pudo ser aislada en una muestra proveniente de Córdoba (C6). No obstante, de acuerdo con Brown y col. (2007), los cuadros clínicos originados por esta serovariedad son de tipo septicémico, con una alta letalidad, lo que hace poco probable que fuera detectada con el esquema de muestreo utilizado.

Salmonella Typhimurium fue la serovariedad más prevalente en cerdos en terminación de granjas argentinas, seguida de *S. Derby*. Esto parece estar en gran

acuerdo con la situación a nivel mundial, ya que, por ejemplo, según Sanchez y col. (2007) estas dos variedades también son las más prevalentes en cerdos de América del Norte y Europa, lo que puede verse también en los resultados reportados por Methner y col. (2011) y Visscher y col. (2011) en Alemania, en la isla Reunión (Francia) (Cardinale y col., 2010) y en Canadá (Rajic y col., 2005; Farzan y col., 2006).

En Dinamarca, estas dos serovariedades también son las más prevalentes, aunque los informes describen una mayor paridad, inclusive con una leve diferencia de *S. Derby* (34,4%) por sobre *S. Typhimurium* (31%) (EFSA, 2009). Esto puede estar relacionado a la gran cantidad de medidas aplicadas en la producción porcina danesa para el control específico de *S. Typhimurium*, sobre todo para eliminar subtipos multiresistentes a los antimicrobianos, como la DT104 (Arguello y col., 2013). Según Li y col. (2013), *S. Derby* también fue la principal serovariedad aislada en animales de consumo en China, el principal productor de cerdos del mundo.

En el caso de España, la situación reportada por García-Feliz y col. (2007) parece un tanto diferente, ya que, si bien *S. Typhimurium* fue la principal serovariedad aislada de cerdos, fue en este caso seguida de *S. Rissen*, y un tanto más abajo aparece *S. Derby*. Esta baja prevalencia de granjas positivas a *S. Derby* ha sido confirmada luego por la EFSA durante el monitoreo realizado en 2008 (EFSA, 2009). La serovariedad *S. Rissen* ha sido confirmada en diversas ocasiones como una de las más relevantes en las explotaciones de cerdos españoles (Arguello y col., 2012). Esto difiere con el presente trabajo, donde *S. Rissen* sólo fue aislada en una granja de 650 madres, aunque con una alta prevalencia intrapredial, ya que se identificó en el 50% de los cerdos en edad de faena analizados.

A nivel regional, en Brasil la situación parece ser similar a la encontrada en Argentina. Sobre todo si consideramos en forma conjunta los estudios realizados por Silva y col. (2009) donde *S. Derby* fue la serovariedad de *Salmonella* más

frecuentemente aislada en cerdos en faena en el estado de Mato Grosso, sumado a Bessa *y col.* (2004) y Schwarz *y col.* (2009) quienes reportaron a *S. Typhimurium* como la más frecuentemente aislada en cerdo faenados en Rio Grande do Sul, y finalmente a Kich *y col.* (2011) que recuperaron *S. Typhimurium* y *S. Derby* en cerdos de 12 piaras de Santa Catalina.

Según Rincón *y col.* (2008), en Colombia parece haber una mayor preponderancia de animales infectados con *S. Typhimurium* (47%) por sobre *S. Derby* (14%), con respecto a la encontrada en el presente trabajo. Sin duda, el hecho de que los autores trabajaran con muestras de hisopados de canales de cerdo en un solo frigorífico, sumado al relativo bajo número de animales muestreados (156), y considerando que no se especifica si los animales provenían de una misma granja o no y a que fueron aisladas más de 15 serovariedades, hace difícil reconocer si realmente representa la situación en la producción porcina en ese país.

La realidad en Chile sí parece ser diferente a la argentina, ya que *S. Infantis*, junto con *S. Typhimurium*, parece ser la serovariedad más frecuentemente aislada entre los cerdos de diferentes granjas porcinas de ese país (Villamir *y col.*, 2012). En ese caso, los autores trabajaron con 850 muestras de materia fecal de cerdos de 29 granjas de diferentes regiones de Chile, metodología que, en grandes rasgos, coincide con la utilizada en el presente trabajo, donde se pudo identificar *S. Infantis* en sólo una granja. Sin embargo, esta serovariedad ha sido frecuentemente reportada en otros países como una de las más prevalentes en la producción de cerdos (Carlson *y col.*, 2001; Methner *y col.*, 2011; Carlsson *y Elvander*, 2012; Arguello *y col.*, 2013).

En la Argentina, el hecho de que *Typhimurium* fuera la más prevalente en las granjas de cerdos, coincide con lo planteado por Caffer *y col.* (2010) sobre el reciente surgimiento de esta serovariedad como la más frecuentemente identificada por el del

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” en muestras de humanos, animales y alimentos en el país.

Como puede verse, *S. Typhimurium* y *S. Derby* son las serovariedades más prevalentes en los cerdos de la mayoría de los países del mundo. Esto puede estar relacionado con la capacidad de adaptación y virulencia de esta variedad, lo que según Baptista y col. (2009), lleva a que las granjas infectadas con *S. Typhimurium* sean las que presenten los mayores periodos de infección, con serologías altas en forma sostenida. Las serovariedades *S. Derby* y *S. Infantis* también fueron asociadas a altos niveles de persistencia en granjas. Esto se evidencia notablemente en Suecia, donde a pesar de los estrictos programas de control, y del éxito que tuvieron los mismos (sólo dos granjas denunciadas como positivas a *Salmonella* durante 2012), estas tres variedades fueron las reportadas como las presentes en cerdos durante los programas de vigilancia en los últimos años (Carlsson y Elvander, 2012).

5. Caracterización genotípica de las poblaciones de *Salmonella* en cerdos en Argentina

La evaluación de los perfiles genéticos permitió identificar una gran diversidad de pulsotipos entre las serovariedades analizadas. En la mayoría de las granjas, un sólo pulsotipo fue identificado en la piara entre los aislamientos de una misma serovariedad, aunque, en dos granjas se aislaron diferentes pulsotipos de la serovariedad predominante en la piara. Sin embargo, en estas últimas no se puede descartar la posible relación entre las diferentes cepas, ya que los perfiles genéticos sólo diferían en 4 o menos bandas, diferencia que según Tenover y col. (1995) podrían originarse con tan solo dos eventos genéticos. Por lo tanto, estos resultados coinciden con lo encontrado en Dinamarca por Arguello y col. (2013), donde el 89,2% de las granjas infectadas con *S. enterica* tenían un solo cluster entre sus animales. Para los autores, esto indica que, en forma general,

las poblaciones de *Salmonella* a nivel de la granja están bien establecidas, con una cepa que domina en el ambiente de la granja.

Según los perfiles de ADN obtenidos en las cepas de *S. Derby* recuperadas de cerdos, el *cluster A* fue identificado en una de cada dos granjas donde se aisló esta serovariedad, con aislamientos en 3 provincias diferentes. Sin embargo, no se identificó el mismo pulsotipo más allá de aislamientos de la misma piara. Considerando que según Hauser y *col.* (2011) es frecuente encontrar una alta diversidad de pulsotipos en esta serovariedad, es interesante remarcar que los *clusters A* y *B*, que por otra parte están posiblemente relacionados, con 6 bandas o menos de diferencia, fueron encontrados en granjas ubicadas en la zona sur de Córdoba, la que fuera propuesta como de alto riesgo en el presente estudio. La cercanía geográfica y la similitud de los *clusters* recuperados, plantea la hipótesis de un origen común o de la posible transmisión entre una y otra granja, aunque mayores estudios son necesarios para tratar de establecer esta relación. Para Litrup y *col.* (2010) el gran polimorfismo presente en la serovariedad *S. Derby* hace que para evaluar la relación entre dos cepas sea necesario utilizar técnicas de alto poder discriminatorio como el MLST o los *DNA microarray*. Otra de las técnicas surgidas en los últimos años y que podría ser útil en este sentido, es el *Multilocusvariable-number of tandem-repeats analysis* (MLVA), que se basa en la discrepancia que existe entre diferentes linajes de un agente bacteriano en la variabilidad en el número de copias de secuencias repetidas de ADN en un loci específico del genoma (Bergamini y *col.*, 2011).

Entre los aislamientos de *S. Typhimurium*, se identificaron 4 *clusters*, dos de ellos (*A* y *B*), ampliamente distribuidos en granjas de diferentes zonas del país. Además, el mismo pulsotipo fue recuperado de las dos granjas muestreadas en San Juan (Sj1 y Sj2); y en una granja de Córdoba (C20) con una de Buenos Aires (B6). En el primer caso, los hallazgos eran esperables, ya que a pesar de haber sido muestreadas en diferentes momentos, las granjas distan a un par de km una de otra, y por lo tanto es de esperar que

compartan algunos factores de riesgo, lo que hace más probable que las cepas tengan un origen en común. Sin embargo, en el segundo caso existe una diferencia de cientos de kilómetros entre una y otra granja, por lo que la estrecha relación entre estas cepas no pudo ser justificada, y constituye un interesante punto a ser investigado en el futuro.

Muchos son los factores que podría permitir la diseminación de subtipos de *Salmonella* entre diferentes granjas. Por ejemplo, es frecuente que veterinarios o vendedores visiten y asesoren diferentes sistemas productivos, pudiendo llegar a actuar como vectores en la transmisión (Cardinale *y col.*, 2010). El alimento también ha sido reportado como una fuente de *Salmonella* en múltiples ocasiones (Benschop *y col.*, 2008; García-Feliz *y col.*, 2009; Torres *y col.* 2011), por lo que compartir una fuente común de alimento o de alguno de sus componentes, como el pellet de soja, puede ser también un factor importante. Recientemente, Horton *y col.* (2013) comprobaron la presencia del mismo *cluster* de *S. Typhimurium* en animales domésticos y aves silvestres. Además, un factor importante a considerar es que, en forma general, los establecimientos reemplazan anualmente entre el 35 y 45% del total de cerdas madre a través de la incorporación de cachorras provenientes de empresas de genética. Esta reposición externa de hembras ha sido demostrada como un factor de riesgo importante en la dinámica de diferentes agentes patógenos del cerdo (Griffith *y col.*, 2006), y específicamente para *Salmonella* spp. (Davies *y col.* 2000; Silva *y col.*, 2006; Parada *y col.*, 2013).

CAPITULO III

RELACIÓN GENÉTICA ENTRE CEPAS AISLADAS EN CERDOS Y CEPAS AISLADAS EN HUMANOS

A. INTRODUCCIÓN

1. 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 (EFSA, 2006a), casuística que disminuyó en 2011 a 95.540 casos (EFSA, 2013). 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.*, 2010).

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. A pesar de que salmonelosis no-tifoidea no es una enfermedad de notificación obligatoria en el país, por lo que no se cuenta con datos estadísticos de presentación, según datos del Laboratorio Nacional de Referencia durante los últimos años las principales serovariedades identificadas son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, que representaron el 25% y 11% del total de 934 aislamientos de *Salmonella* de origen

humano serotipificados en el 2012. Además, *S. Typhimurium* ha sido asociada a 19 brotes alimentarios desde el 2005 hasta la fecha (Fuente: Servicio de Enterobacterias - INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”)

2. Salmonelosis y animales de consumo

La importancia de la presencia de *Salmonella* en animales de producción para consumo, como aves o bovinos, ha sido ampliamente descrita (Aury *y col.*, 2010; Dahhan *y col.*, 2010; Arnold *y col.*, 2011). 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 estos representan entre el 13,8% y 26,8% de los casos totales (Anónimo, 2005). Resultados similares se obtuvieron en Gran Bretaña (Davies *y col.*, 2004) y para toda la Unión Europea (EFSA, 2010).

Según estudios epidemiológicos sobre la presencia de *S. 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 *S. enterica* (Adley *y col.*, 2011). Ambos estudios irlandeses reportaron 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).

Según Vo *y col.* (2006), en un estudio que comparó las serovariedades de *S. enterica* aisladas de casos clínicos en humanos con aislamientos de alimentos y animales en Vietnam, muchos de los serotipos y fagotipos hallados en humanos también fueron 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.

Campos y col. (2013), describieron la relación y distribución de subtipos genéticos de *S. Typhi*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* aisladas en humanos, que circularon en seis países de América del Sur entre 2005 y 2009. Los autores encontraron una amplia variabilidad entre cepas, sobre todo en *S. Typhimurium*, con 226 perfiles de *XbaI*-PFGE entre 554 cepas analizadas. Además, hallaron algunos pulsotipos que habían sido aislados en diferentes países, como por ejemplo el denominado ALJPXX01.0027, que representaba el 5,4% de las cepas y fue aislado en Argentina y Brasil.

En Argentina, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” reportó en los últimos años 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).

Flavier y col. (2013), realizaron un monitoreo en alimentos de origen animal, que estaban en venta al público en San Luis entre 2005 y 2011, y encontraron que el 6,32% de las 427 muestras de pollo, cerdo y huevos analizadas fueron positivas a *Salmonella*. Además, los aislamientos en carne de cerdo representaron el 22,3% de las muestras positivas, donde la serovariedad aislada fue *S. Anatum*.

3. 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 y Barret, 1992; Versalovic y col., 1994; Olive y 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., 2005; Sandt y col., 2006; Kérouanton y col., 2007; Vigo y col., 2009; Dahhan 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. En otro estudio, Werber y col. (2005) lograron identificar un subtipo de *S. Oranienburg*

que en 2001-2002 causó un brote de más de 439 casos de salmonelosis en humanos en diferentes países de la UE.

Los resultados esperados en este último capítulo aportarán información sobre la importancia del cerdo dentro de la epidemiología de la salmonelosis en humanos en el país, por constituir una posible fuente de contagio o de reservorio de cepas zoonóticas.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO III

Relación genética entre cepas aisladas en cerdos y cepas aisladas en humanos

h) Establecer la relación genética entre los aislamientos recuperados de cerdos y aislamientos de casos clínicos de salmonelosis en humanos.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Base de Datos

Los perfiles de *Xba*I-PFGE de las serovariedades de *S. enterica* de importancia clínica aisladas de cerdos, obtenidos mediante la metodología detallada en el Capítulo II, fueron comparados con los correspondientes a aislamientos esporádicos y de brotes de origen humano, que están contenidos dentro de la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella*. Esta base es administrada por el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosa “Dr. Carlos G. Malbrán”, y cuenta con más de 2000 patrones de PFGE correspondientes a aislamientos de origen humano, alimentario y animal. La comparación se realizó específicamente para las serovariedades *S. Anatum*, *S. Bredeney*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Oranienburg* y *S. Typhimurium*. Estas fueron seleccionadas por ser las serovariedades aisladas en cerdos con mayor cantidad de registros en la Base de Datos Nacional. Además, para la selección de pulsotipos con los que se compararon los de origen porcino, se tuvieron en cuenta principalmente aquellos perfiles genéticos de los aislamientos obtenidos en los últimos 5 años y que podían estar relacionados según Tenover *y col.* (1995). Esto permitió evaluar si los subtipos identificados en cerdos habían sido detectados antes en el país, en qué tiempos y localidades.

2. Comparación de perfiles de ADN

Para el análisis de la imagen del gel y la construcción de los dendrogramas de los pulsotipos de origen humano, alimentario y animal se utilizó el programa BioNumerics, v.4.0 (Applied Math) aplicando los parámetros establecidos por la Red PulseNet Internacional (optimización 1.5% y porcentaje de tolerancia en la posición de las bandas 1.5%, coeficiente de Dice y método UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - para la construcción de dendrogramas).

La relación entre los pulsotipos de una misma serovariedad se analizó según el número de bandas diferentes entre los perfiles, siguiendo las recomendaciones de Tonover *y col.* (1995), de la siguiente manera:

Perfiles idénticos	sin bandas diferentes
Estrechamente relacionados	≤ 2 bandas diferentes
Posiblemente relacionados	≤ 4 bandas diferentes
Diferentes	≥ 5 bandas diferentes

D. RESULTADOS

Los perfiles obtenidos por *Xba*I-PFGE de las cepas de *Salmonella enterica* aisladas en cerdos y que tienen importancia clínica en humanos, como son *S. Anatum*, *S. Bredeney*, *S. Oranienburg*, *S. Derby*, *S. Infantis* y *S. Typhimurium*, fueron comparadas con los aislamientos de caso clínico de salmonelosis en humanos registrados en la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella*.

1. *Salmonella Anatum*

Los dos perfiles genéticos obtenidos en las cepas de *S. Anatum* recuperadas de MF de cerdos, uno en la granja Sf4 (3 aislamientos) y otro en B1 (1 aislamiento), fueron clasificados como nuevos pulsotipos al ser comparados con las cepas registradas en la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella* (n = 15) (Figura 9). El aislamiento de B1 presentó un perfil muy diferente al de las otras cepas de *S. Anatum* registradas en la Base, con más de 7 bandas diferentes (Figura 9).

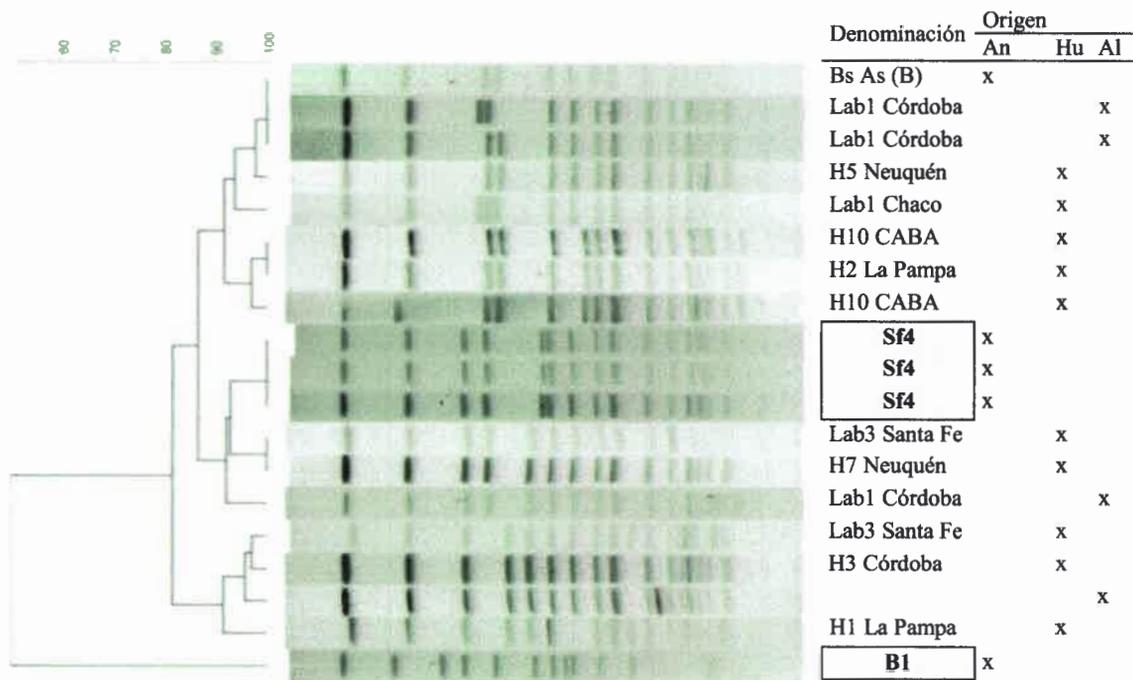


Figura 9: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Anatum* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . Otros aislamientos en bovinos (B).

2. *Salmonella* Bredeney

La Base de Datos Nacional solo contaba con 8 aislamientos, 7 de los cuales fueron recuperados de muestras de cerdos durante un monitoreo en frigorífico en 2007. El perfil genético del aislamiento de *Salmonella* que se utilizó como control positivo en los protocolos de cultivo bacteriológico, fue totalmente diferente a los registrados anteriormente, con más de 8 bandas de diferencia (Figura 10).

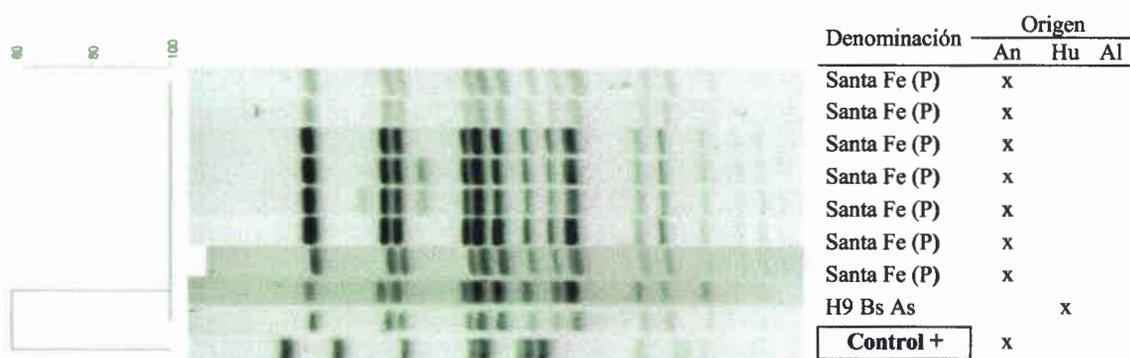


Figura 10: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Bredeney* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. El aislamiento en cerdos que fue utilizado como control positivo se identifica como Control + y el . Otros aislamientos en porcinos (P).

3. *Salmonella* Derby

Los perfiles genéticos de *S. Derby* aisladas en heces de cerdos de las granjas Sf4, C1, C7 y B6 fueron clasificadas como nuevos pulsotipos para la Base Nacional. Los pulsotipos ARJDPX01.0004 y ARJDPX01.0015 aislados en cerdos de las granjas S13 y B14, respectivamente, ya habían sido identificados en casos de salmonelosis en humanos en el país. El perfil genético de la cepa aislada en cerdos de la granja cordobesa C7 difirió en una banda del pulsotipo ARJDPX01.0004, aislado en alimentos en esa misma provincia (Figura 11).

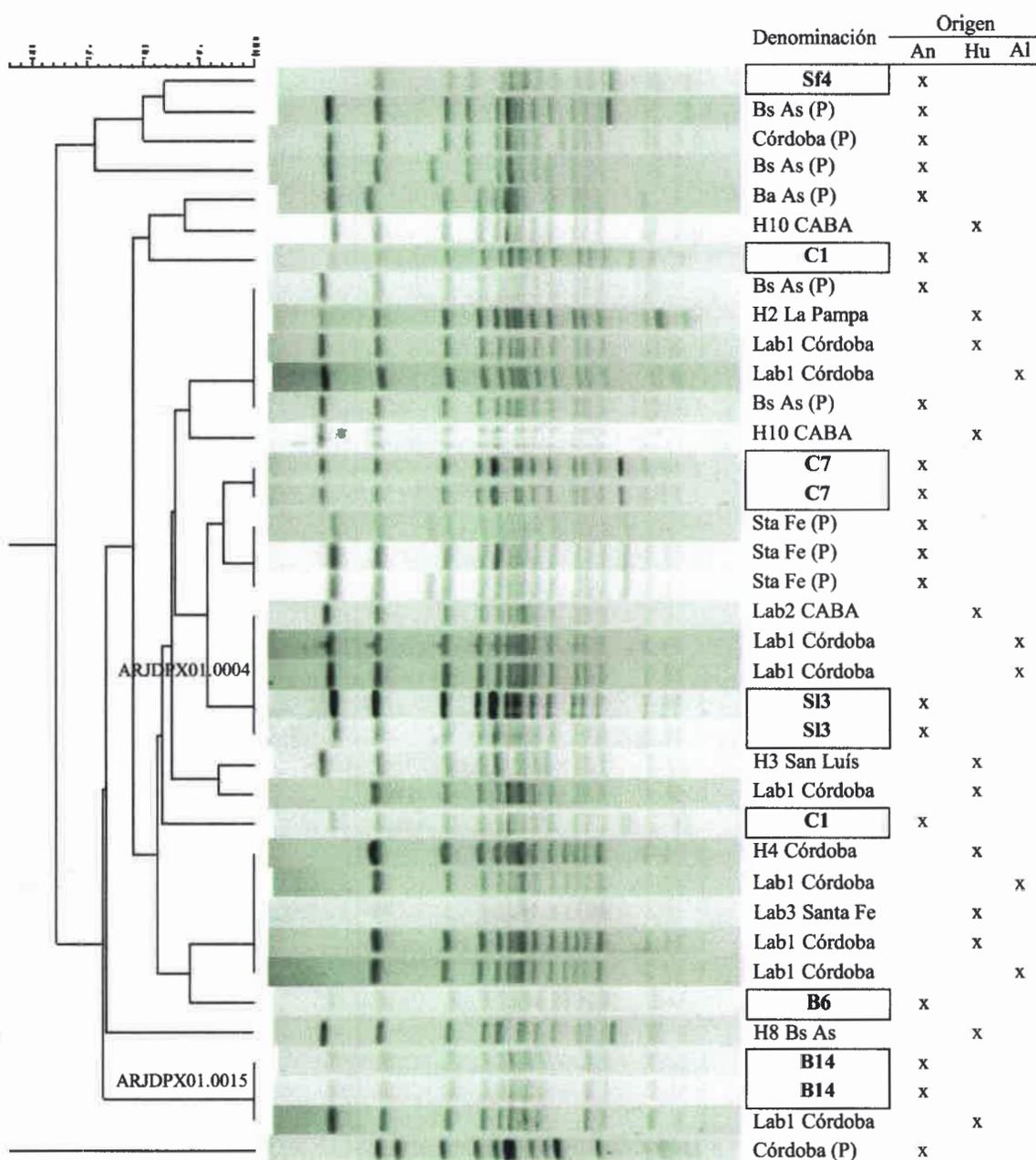


Figura 11: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Derby* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . Otros aislamientos en porcinos (P). ARJD= código de identificación internacional del pulsotipo.

4. *Salmonella* Heidelberg

Los dos aislamientos de *S. Heidelberg* en cerdos presentaron pulsotipos nuevos para la Base de Datos. El perfil de B13 tuvo menos de dos bandas de diferencia con un aislamiento en humanos en la misma provincia en 2008. La cepa aislada en C6 resultó estrechamente relacionada a un aislamiento de 2012 en humanos en Córdoba (Figura 12).

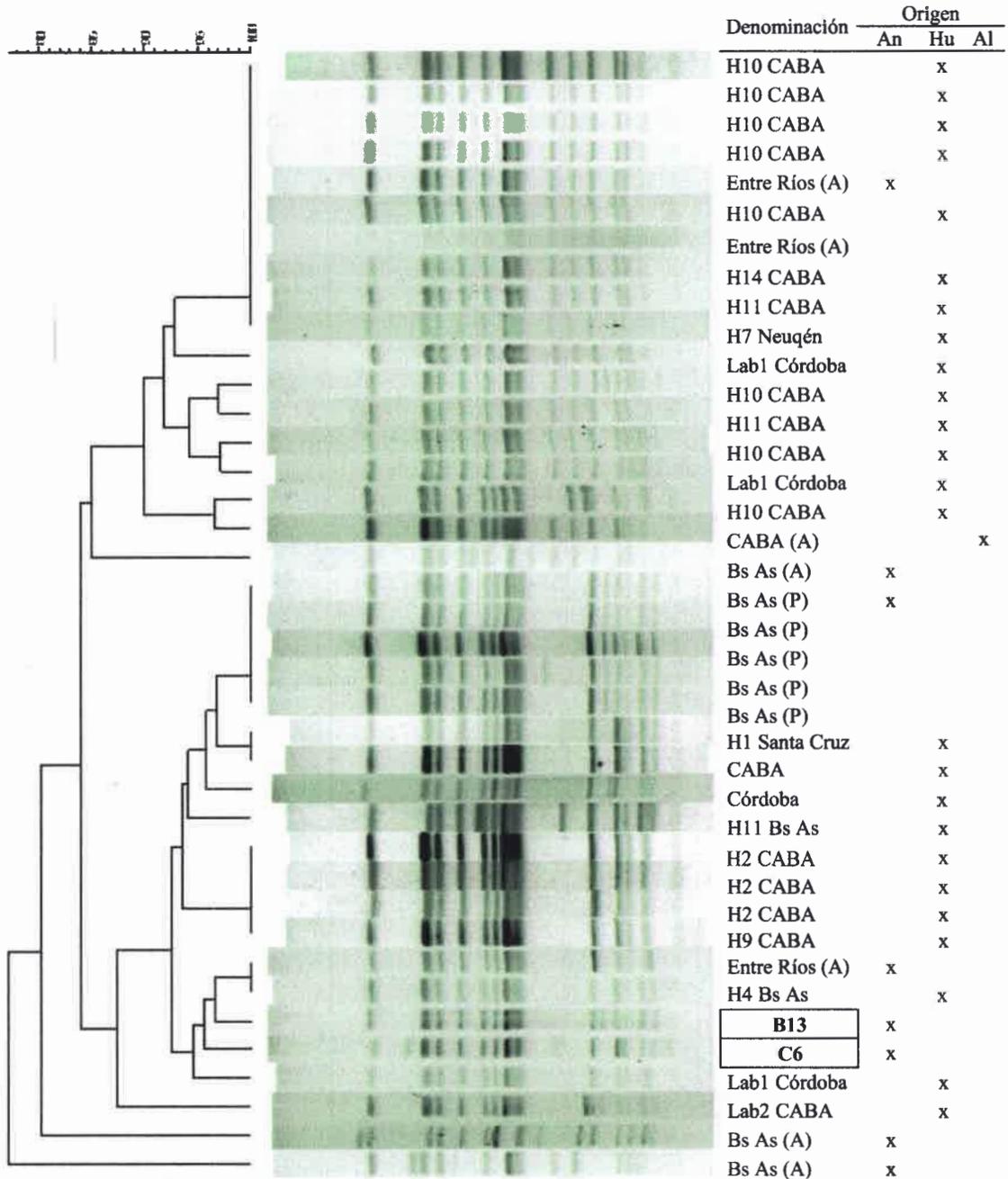


Figura 12: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Heidelberg* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . Otros aislamientos en aves (A) y porcinos (P).

5. *Salmonella* Infantis

Los dos aislamientos recuperados de cerdo de la granja B1 presentaron un pulsotipo nuevo para la Base de Datos (Figura 13).

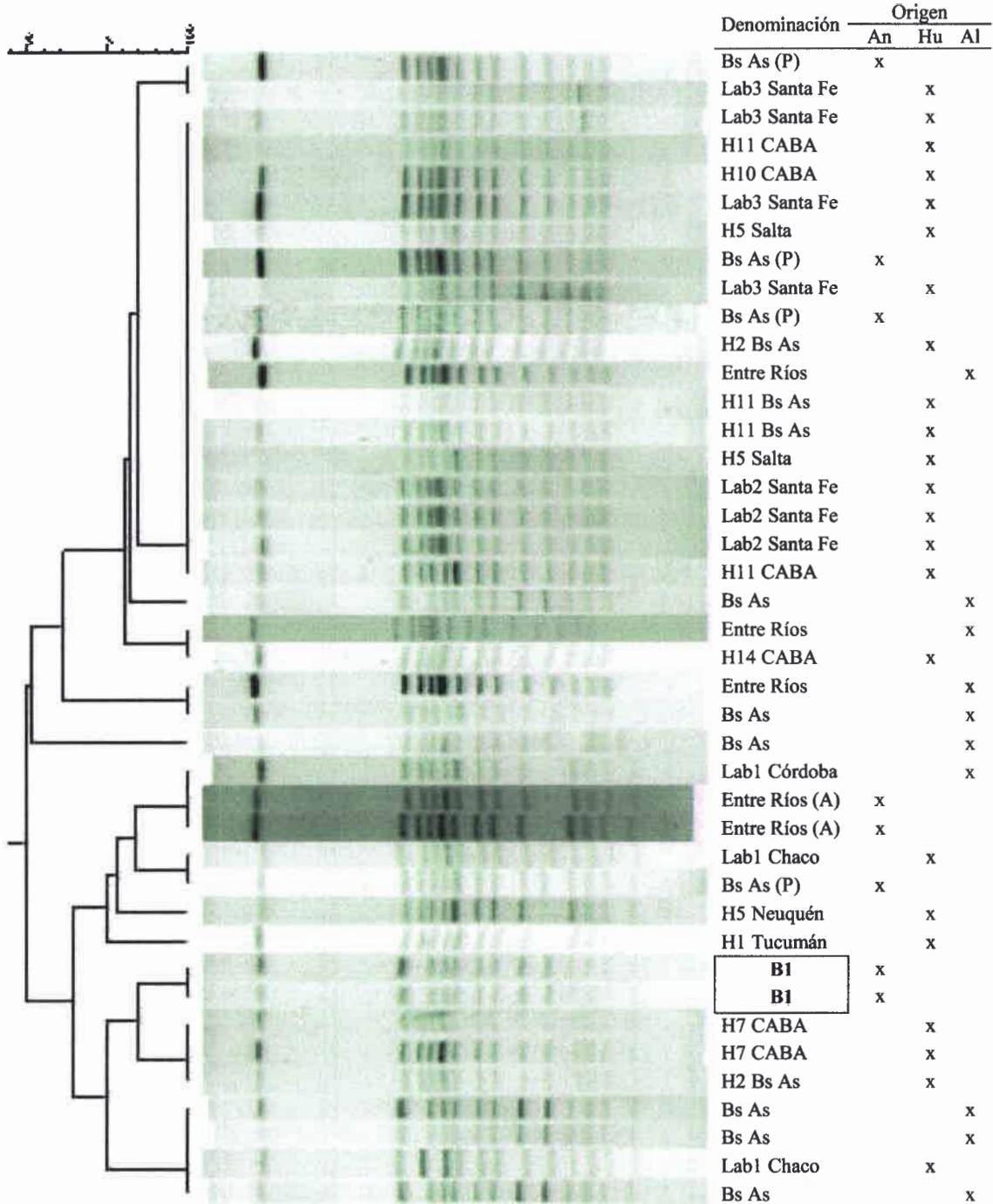


Figura 13: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Infantis* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . Otros aislamientos en aves (A) y porcinos (P).

6. *Salmonella* Oranienburg

El aislamiento de *S. Oranienburg* en MF de cerdos de una granja ubicada en Santa Fe (Sf1), fue identificado como pulsotipo ALJXX01.0007, subtipo registrado en un brote con 7 casos de salmonelosis en personas de diferentes provincias (Figura 14). Además, fue el primer aislamiento de esta serovariedad en animales registrado en la Base Nacional de Subtipos de Salmonella.

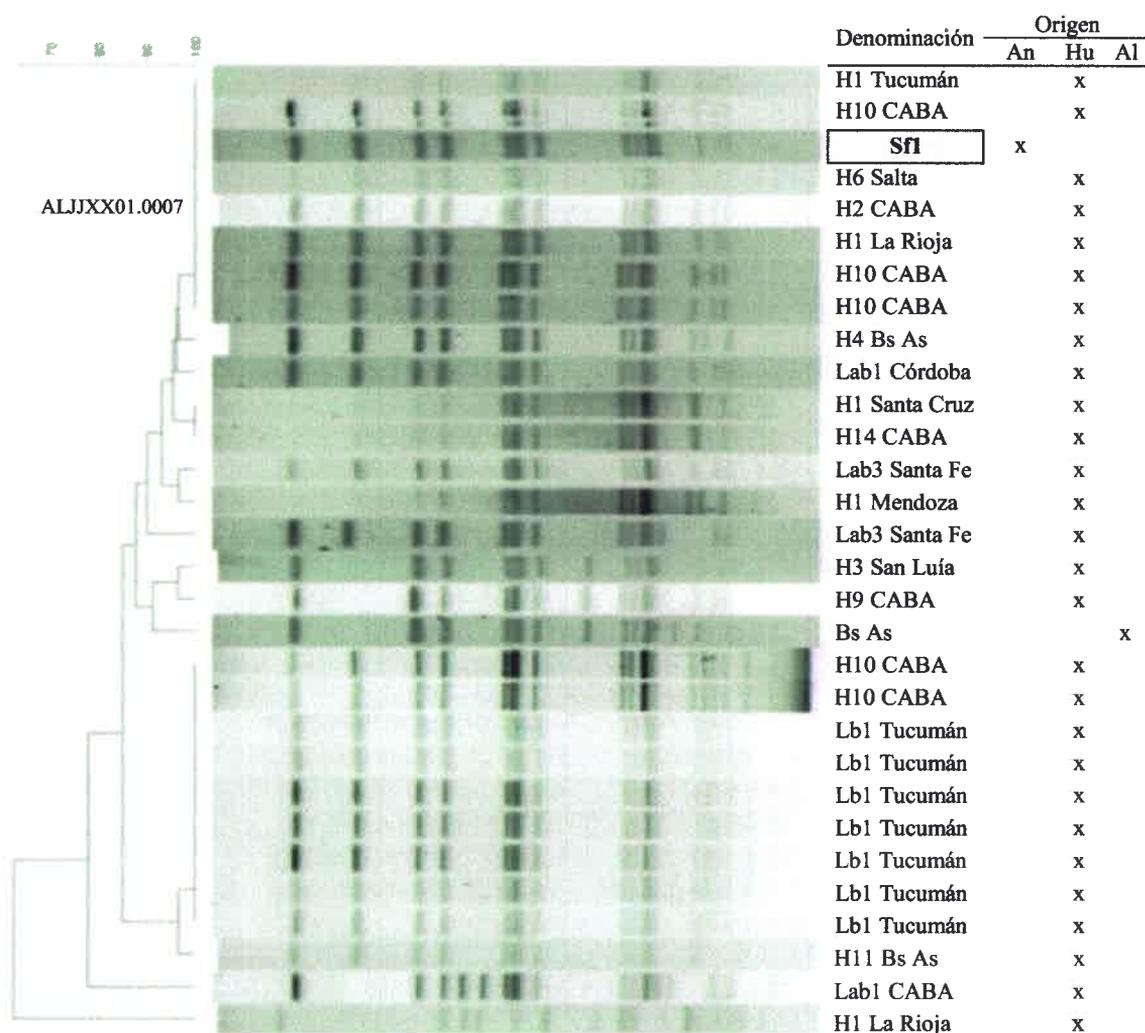


Figura 14: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Oranienburg* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . ALJJ= código de identificación internacional del pulsotipo.

7. *Salmonella* Typhimurium

Debido a la extensa cantidad de cepas de *S. Typhimurium* registradas en esa base de datos ($n = 1.304$), solo se muestran los pulsotipos más relacionados con los aislamientos en cerdos ($n = 148$) (Figura 15). La cepa aislada de cerdos en la granja C3 correspondió al pulsotipo ARJPXX01.0330, que fue aislado en un caso de salmonelosis en humanos en Córdoba. Además, difiere en 2 o menos bandas con el pulsotipo ARJPXX01.0204, que fuera aislado de casos clínicos en humanos en 5 provincias (Figura 16).

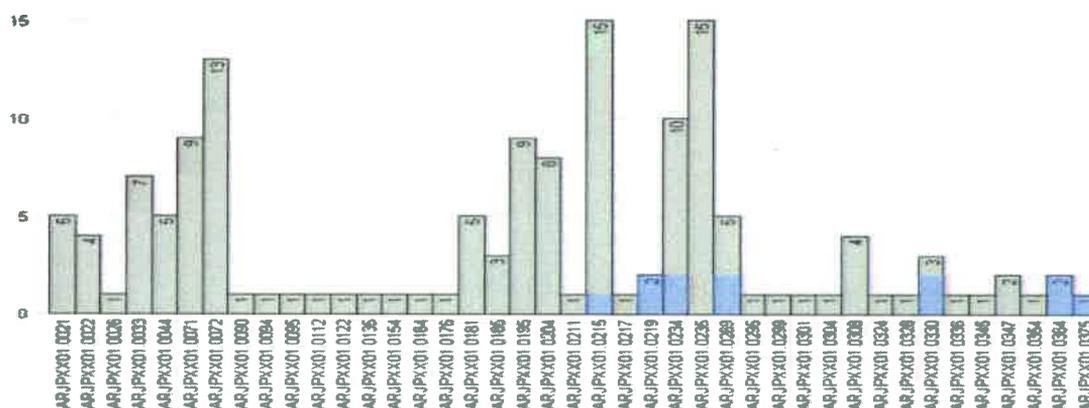


Figura 15: Cantidad de aislamientos de los pulsotipos de *S. Typhimurium* registrados en la Base de Datos, con perfiles similares a los aislados en cerdos. En otro color puede verse los pulsotipos aislados en cerdos.

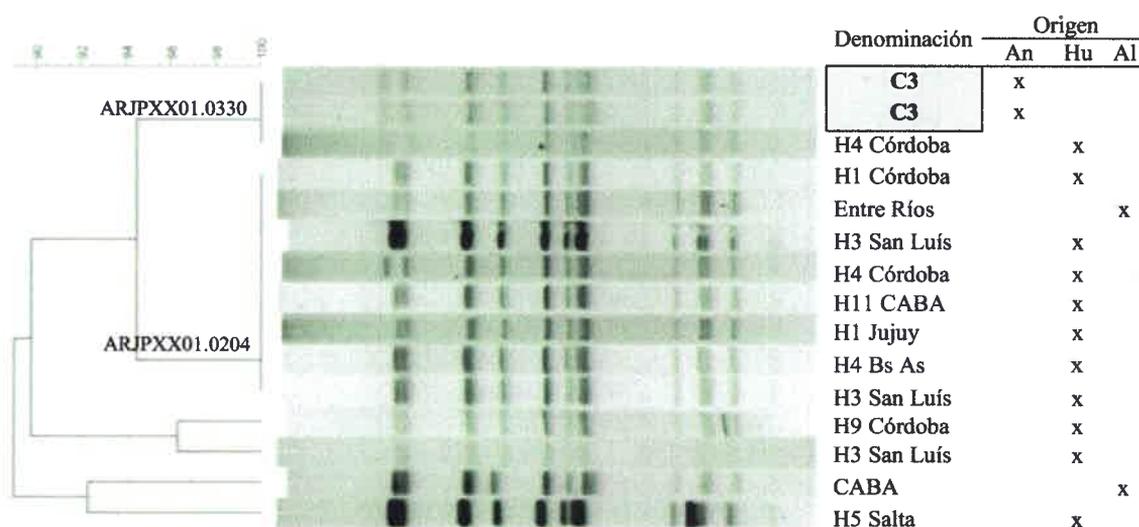


Figura 16: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Typhimurium* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . ARJP= código de identificación internacional del pulsotipo.

Las cepas de *S. Typhimurium* aisladas en MF de cerdos de las granjas de San Juan (Sj1 y Sj2) fueron clasificadas en el pulsotipo ARJPXX01.0269, un subtipo que ha sido identificado en una extensa cantidad de casos de salmonelosis en humanos en gran parte del país (Figura 17).

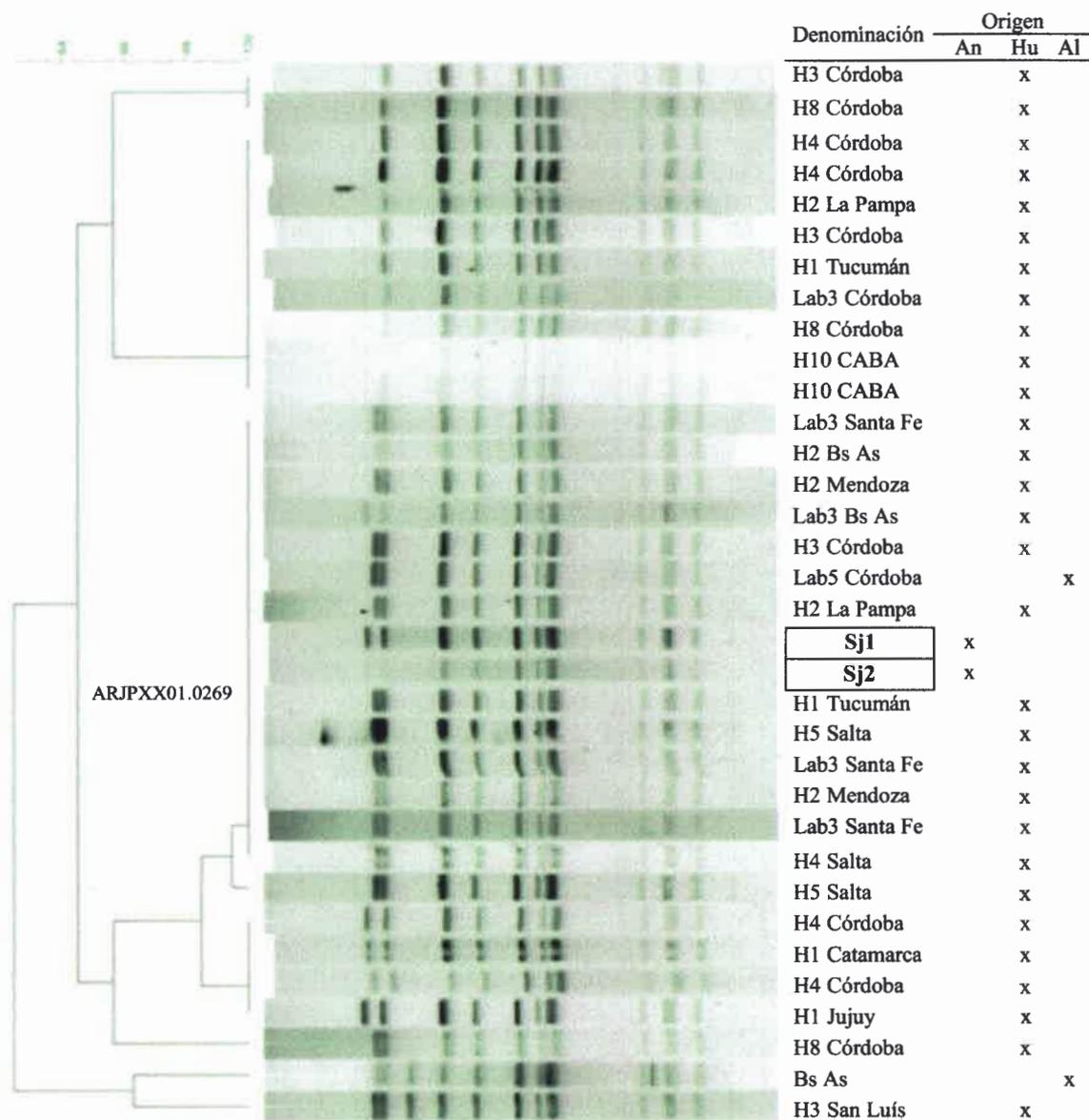


Figura 17: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Typhimurium* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . ARJP= código de identificación internacional del pulsotipo.

Los aislamientos de *S. Typhimurium* de las granjas C3 y B6 fueron identificados con el pulsotipo ARJPXX01.0234, que fue aislado en 8 casos de salmonelosis en humanos en 6 provincias del país. Estas dos cepas fueron los primeros aislamientos de este pulsotipo en animales, que además, difieren en tan solo una banda con el pulsotipo ARJPXX01.0235, de frecuente presentación en humanos (Figura 18).

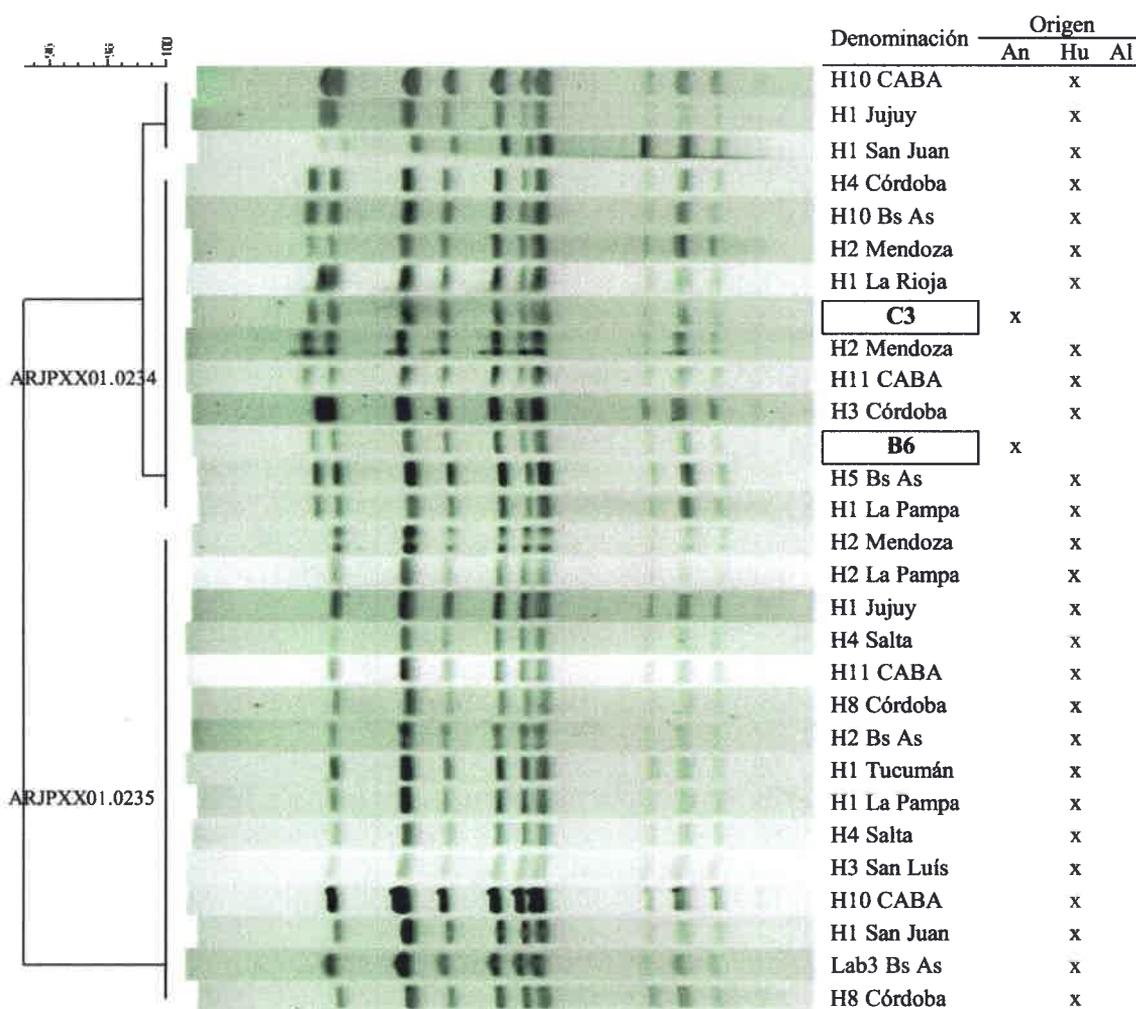


Figura 18: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Typhimurium* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . ARJP= código de identificación internacional del pulsotipo.

Los perfiles genéticos de las cepas de *S. Typhimurium* aisladas en B17, y una de las aisladas en Sjl, no habían sido identificados anteriormente y se identificaron como nuevos pulsotipos para la Base de Datos Nacional (Figura 19).

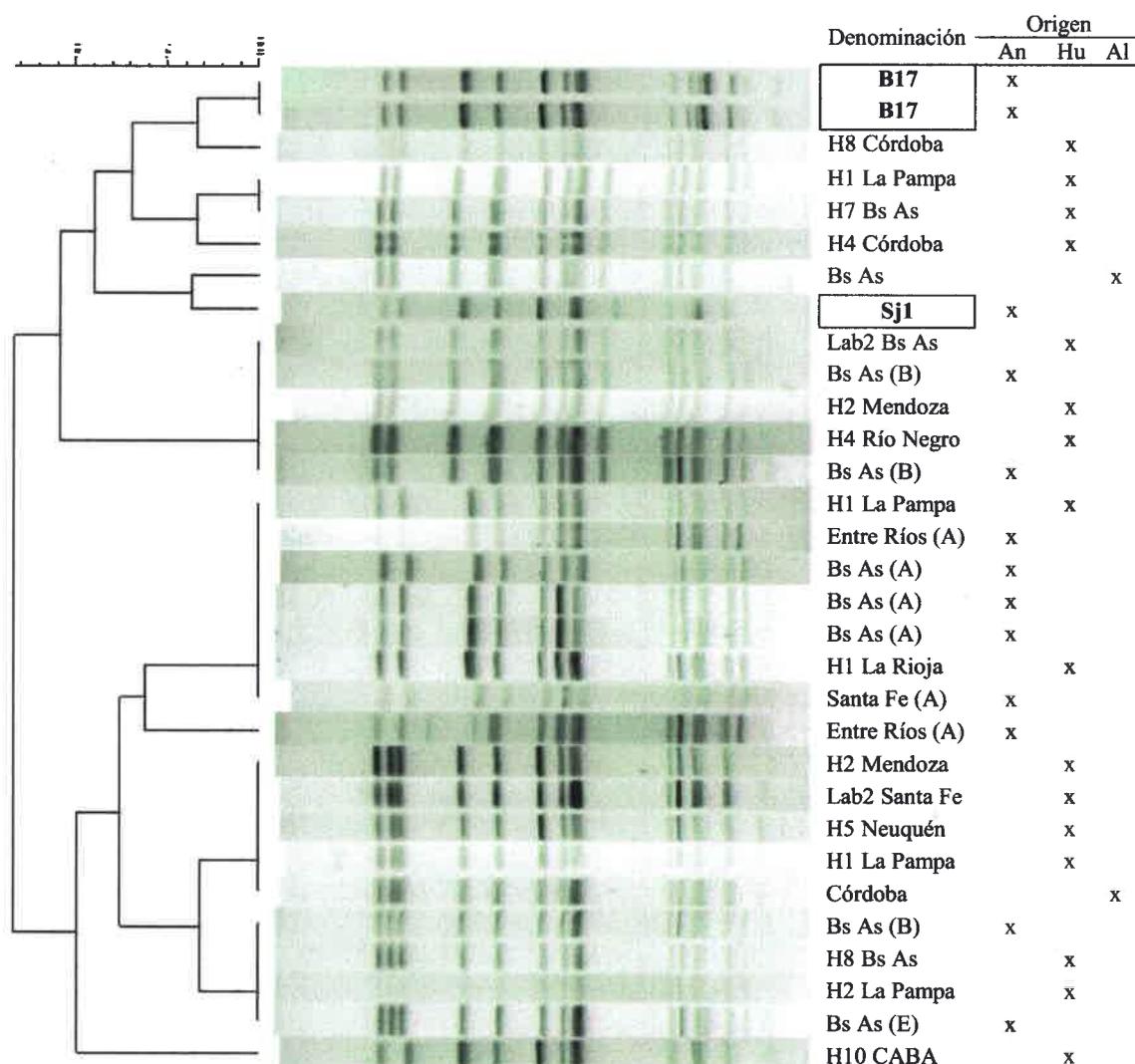


Figura 19: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Typhimurium* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) o laboratorio (Lab) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . Otros aislamientos de aves (A), bovinos (B) y equinos (E).

La cepa de *S. Typhimurium* aislada en cerdos de San Luís (S13) fue identificada como pulsotipo ARJPXX01.0215, subtipo responsable de gran cantidad de casos de salmonelosis en humanos en los últimos 5 años, y de un importante brote en Neuquén en 2012 (Figura 20).

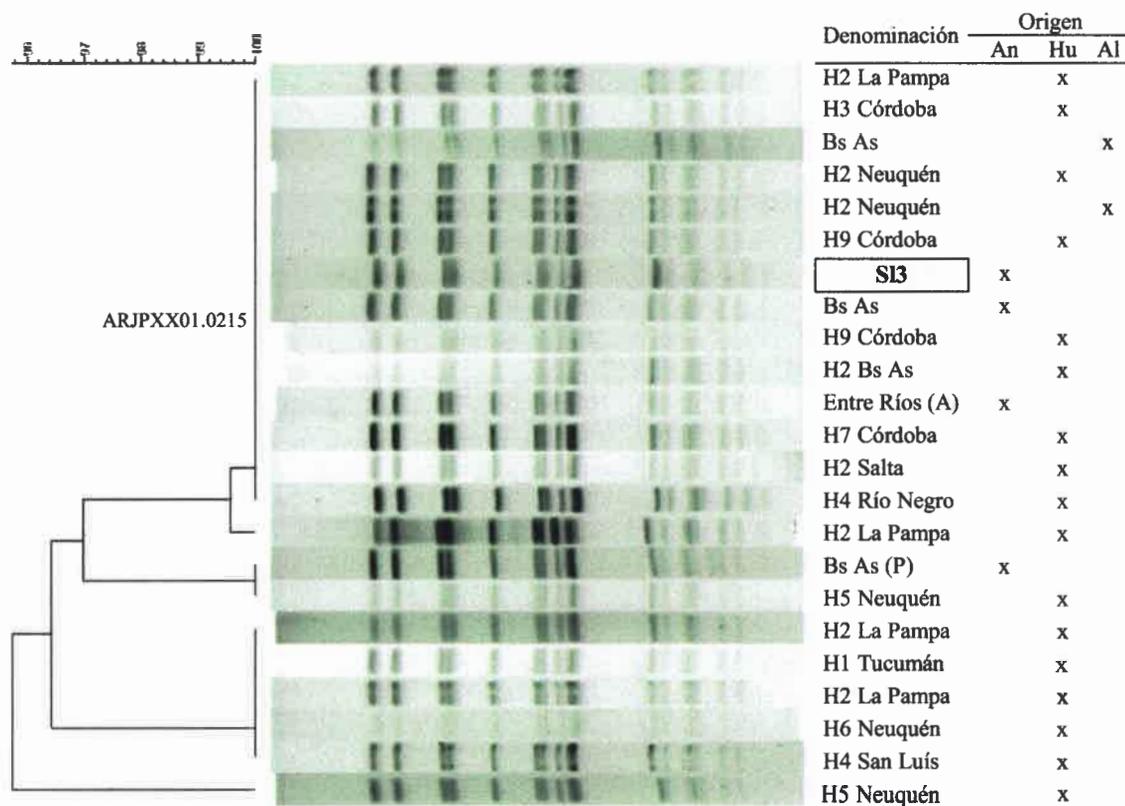


Figura 20: Dendrograma con los pulsotipos de *S. Typhimurium* aisladas de Animales (An), Humanos (Hu) y Alimentos (Al). Se detalla el código del hospital (H) donde se realizó el aislamiento y la provincia de origen. Los aislamientos en cerdos se identifican con el código de granja de origen y el . Otros aislamientos de aves (A) y porcinos (P). ARJP= código de identificación internacional del pulsotipo.

E. DISCUSIÓN

La comparación de las cepas de *Salmonella* aisladas en cerdos, con aquellas recuperadas de casos de salmonelosis en humanos, y que fueron registradas en la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella*, permitió reconocer subtipos de algunas serovariedades que circulan en ambas especies, sobre todo en el caso de serovariedades frecuentemente asociadas a cuadros clínicos. Esto coincide con lo hallado por Vo y col. (2006) en Vietnam, donde muchos de los serotipos y subtipos de *Salmonella* recuperados en humanos también fueron frecuentemente aislados en cerdos, por lo que los autores identifican al cerdo como una de las fuentes de infección de salmonelosis no-tifoidea para el humano en ese país.

En el caso de las serovariedades Anatum y Bredeney, todas las cepas aisladas de cerdos fueron clasificadas como nuevos pulsotipos en la Base Nacional, es decir, no se encontraron subtipos compartidos con otras especies. Esto coincide con los escasos reportes encontrados sobre casos clínicos, tanto en humanos como animales, que hayan sido relacionados a estas serovariedades, que más bien son frecuentemente recuperadas de muestreos ambientales en corrales o playas de faena (Magistrali y col., 2008; Torres y col., 2011; Mannion y col., 2012). No obstante, en el caso de *S. Anatum*, pudo evidenciarse una estrecha relación, con menos de 2 bandas de diferencia, entre el pulsotipo encontrado en una granja de Santa Fe (Sf4) con un aislamiento en materia fecal de una persona en la misma provincia (Lab3). Este dato debe ser considerado por el hecho que según Flavier y col. (2013), esta serovariedad fue aislada en el 6,6% de las muestras de carne de cerdo analizadas entre 2005 y 2011, valor que por otra parte es considerablemente superior al reportado en estudios similares en otros países, como el 0,1% encontrado en el Reino Unido (Gormley y col., 2010), o el 2,6% en Irlanda (Prendergast y col., 2009).

En *S. Derby*, la mayoría de los pulsotipos (60%) representaron perfiles nuevos para la Base de Datos. Sin embargo, se pudo identificar dos pulsotipos con una distribución muy amplia. El primer perfil (ARJDPX01.0004) fue aislado de cerdos de una granja en San Luís, de muestras de pollo en Córdoba y un caso clínico de salmonelosis en una persona en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). El segundo perfil (ARJDPX01.0016) correspondió a un pulsotipo identificado en cerdos de una granja de Buenos Aires (B14), que fue identificado también en el aislamiento de materia fecal de una persona con salmonelosis en Córdoba. Si bien no se observó una relación espacial entre los aislamientos, el hecho de que se tratara de perfiles idénticos, señala la posibilidad de que *S. Derby* sea responsable de infecciones cruzadas entre cerdos y personas en el país. Esta posibilidad ha sido comprobada recientemente en Alemania por Hauser *y col.* (2011), quienes encontraron un mismo clon de *S. Derby* responsable de una gran proporción de los aislamientos en cerdos y humanos en ese país, logrando identificarlo, además, en muestras de carne de cerdo.

Los perfiles genéticos de las cepas de *S. Heidelberg* aisladas en heces de cerdos (B13 y C6) no habían sido identificados anteriormente en la Base de Datos. Esto podría deberse a que según Jackson *y col.* (2013), en un estudio de los brotes de salmonelosis no-Typhi en humanos en Estados Unidos entre 1998 y 2008, esta serovariedad estuvo principalmente asociada al consumo de alimentos de origen aviar. No obstante, el aislamiento de cerdos de la granja en Buenos Aires (B13) resultó estrechamente relacionado, con menos de 2 bandas de diferencia, al aislamiento reportado por un hospital de esa provincia en un caso de salmonelosis en humanos.

Sorprendentemente, a pesar de que *S. Infantis* constituye una de las serovariedades más importantes en la casuística de salmonelosis en humanos, por lo que la Base de Datos cuenta con una cantidad relativamente alta de aislamientos ($n = 67$), no se encontraron subtipos encontrados en cerdos que coincidieran con aislamientos en otras

especies. Cabe destacar, que esta serovariedad presentó una muy baja prevalencia entre las granjas porcinas, con tan sólo una granja positiva (B1). Todo esto sugiere una baja importancia del cerdo como fuente de transmisión de cepas de *S. Infantis* al hombre, por lo menos en nuestro país.

Un dato interesante surge del análisis del aislamiento de *S. Oranienburg* recuperado de cerdos en Sata Fe, cuyo perfil (ALJJXX01.0007), fue idéntico al que durante 2011 y 2012 produjo una serie de casos clínicos en personas de Salta, Tucumán, La Rioja y la CABA. Más allá de algunos reportes que la asocian a brotes de salmonelosis en animales (Kaneene *y col.*, 2010), poco se conoce sobre esta serovariedad. Aunque, en 2001-2002 fue responsable de un importante brote de salmonelosis, que afectó a más de 439 personas en Alemania y otros países de la UE, y que fue asociado al consumo de chocolates contaminados (Werbel *y col.*, 2005). La coincidencia temporal del aislamiento en cerdos con los recuperados en humanos en distintas partes del país, refuerza la idea de poblaciones compartidas entre especies, y aparece como un caso destacado a tener en cuenta para futuras investigaciones.

Por último, el análisis de *S. Typhimurium*, que ha sido la serovariedad más prevalente en granjas porcinas argentinas y que representa la serovariedad más importante en lo que respecta a salmonelosis no-typhi en humanos. Tal es así, que la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella* cuenta con 1.304 perfiles de ADN de aislamientos de *S. Typhimurium* recuperados de humanos (1077), animales (120), alimentos (60) y otros (47). Entre los que se reconocen 379 pulsotipos diferentes. Esta variabilidad ya ha sido reportada en el país por Campos *y col.* (2013).

De los 12 aislamientos de *S. Typhimurium* recuperados de cerdos de 8 granjas en diferentes provincias, 3 cepas correspondientes a 2 granjas (C11 y Sj1) fueron identificados como perfiles nuevos para la Base Nacional de Subtipos de *Salmonella*. Mientras que el 75% de los aislamientos en cerdos fueron clasificados dentro de uno de

los perfiles ya existentes en la base de datos. Esto parece indicar la existencia de una relación estrecha, con subtipos genéticos de esta serovariedad que circulan en cerdos, con las que se aíslan en casos clínicos en humanos, lo que coincide con lo encontrado por Son *y col.* (2013), quienes destacan la importancia de los animales de consumo como reservorio/fuente de infección de cepas de *S. Typhimurium* en los casos de salmonelosis en humanos en Estados Unidos.

Por ejemplo, el pulsotipo ARJPXX01.0330 aislado en cerdos de la granja 3 de Córdoba (C3), también fue reportado el mismo año por un hospital de esa provincia en un caso de salmonelosis en una persona. Otro ejemplo notable, es el de los aislamientos recuperados de las 2 granjas de San Juan (Sj1 y Sj2) que fueron clasificados dentro del perfil ARJPXX01.0269, que ha sido identificado en los últimos 3 años en casos de salmonelosis humana en 7 provincias diferentes. El pulsotipo ARJPXX01.0234 presente en las granjas 3 de Córdoba (C3) y 6 de Buenos Aires (B6), aparece ampliamente distribuido en el país. O el caso del pulsotipo ARJPXX01.0215 aislado en la granja 3 de San Luis (Sl3), disperso en gran parte del país, y que en 2012 fuera responsable de un importante brote de salmonelosis en Neuquén.

Algo importante a considerar, y que remarca la importancia de estos hallazgos, es la amplia resistencia a múltiples antimicrobianos que suele presentarse en las cepas de *S. Typhimurium*, y que ha sido frecuentemente reportada en aislamientos en animales y humanos (Majtan *y col.*, 2010; Kich *y col.*, 2011; Hur *y col.*, 2012; Bolton *y col.*, 2013). Según Arguello *y col.* (2013), en Dinamarca casi 1 de cada 2 cepas de *S. Typhimurium* aislada de cerdos es resistente a uno o más antimicrobianos. Sin embargo, poco se conoce sobre resistencia a antibióticos de las poblaciones de *Salmonella* presentes en cerdo en Argentina. Esto plantea la necesidad de futuras investigaciones que evalúen la capacidad de resistencia a antimicrobianos, y los mecanismos involucrados, en las cepas de *Salmonella* que circulan en cerdos en Argentina.

Hasta donde se conoce, el presente trabajo es el primero en describir la presencia de subtipos de las principales serovariedades *S. enterica* que se presentan en cerdos en edad de faena y que han sido reportados en casos de salmonelosis en humanos en la Argentina. Si bien este estudio no se focaliza en el origen de las infecciones, esto plantea una situación epidemiológica en el país que resulta similar a la reportada en otras partes del mundo, donde se reconoce al cerdo como una de las fuentes de salmonelosis no-tifoidea en humanos (Davies *y col.*, 2004; Anónimo, 2005; EFSA, 2010; Son *y col.*, 2013).

CONCLUSIONES
GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. La detección de *Salmonella* spp. en heces mediante PCR requirió de un cultivo primario incubado por 12 h, seguido de otro selectivo por al menos 4 h para lograr amplificar el gen *invA* en muestras donde se aisló el patógeno. Las altas concentraciones de ADN heterólogo y la presencia de inhibidores de reacción propios de la materia fecal parecen ser las principales dificultades a vencer para lograr la detección rápida de *Salmonella* spp. en heces.
2. La PCR en tiempos cortos del cultivo secundario (RV 4 h) podría constituir un método adecuado para el monitoreo de *Salmonella* spp., por ser la técnica de mayor sensibilidad relativa entre los métodos analizados. Sin embargo, las diferencias en especificidad y valor predictivo positivo con respecto al cultivo bacteriológico, indican la detección de bacterias posiblemente injuriadas o incapaces de sobrevivir en las condiciones astringentes de los cultivos selectivos.
3. El excelente grado de acuerdo entre el cultivo bacteriológico y la PCR a partir de las 8 h de cultivo selectivo (RV), propone a este método molecular como un buen predictor del resultado del cultivo bacteriológico, factible de utilizar como prueba tamiz.
4. La prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella* spp. en la Argentina es muy similar a las medias regionales e internacionales reportadas por organismos oficiales y estudios particulares.
5. La prevalencia de granjas infectadas por *Salmonella* spp. fue mayor entre las piaras de más de 1001 madres, lo que podría estar relacionado a una frecuente alta presión productiva en estos establecimientos, que puede incrementar las condiciones de estrés de los cerdos, aumentando la susceptibilidad de los mismos.

6. En las granjas infectadas, cerca de 1 de cada 10 cerdos en edad de faena excretaban *Salmonella* spp. en sus heces. Esto debería ser especialmente considerado por constituir un riesgo importante para la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria en el país.

7. Coincidiendo con estudios en otras partes del mundo, el presente trabajo expone la extensa distribución de *S. Typhimurium* y *S. Derby* en cerdos de diferentes pjaras del país. Considerando la reconocida patogenicidad de estas serovariedades, se subraya la importancia de considerar estos patógeno como uno de los desafíos a superar para mejorar la productividad y sanidad de la producción porcina nacional.

8. La existencia de subtipos estrechamente relacionados de *S. Typhimurium*, y también de *S. Derby*, que se encuentran distribuidos en diferentes regiones del país, plantea la necesidad de investigar las posibles fuentes comunes o vectores que faciliten la diseminación de estos patógenos. Esta información debería ser considerada como necesaria, sobre todo si se pretendiera implementar programas de control de *Salmonella* en granjas porcinas.

9. Se pudo comprobar la existencia subtipos genéticos de diferentes serovariedades de *Salmonella* spp. que fueron aislados tanto en cerdos como en humanos en Argentina. Esto remarca la importancia de cerdo como reservorio y/o fuente de infección de cepas zoonóticas de *Salmonella* en el país.

10. La particular situación de *S. Typhimurium* como la principal serovariedad aislada en cerdos y en el humano en el país reviste gran importancia por tratarse de una de las serovariedades más virulentas del género. Sumado a que la gran mayoría de las cepas aisladas en cerdos fueron clasificadas dentro de subtipos genéticos ya identificados en humanos, parece ser un factor a considerar a la hora de evaluar la necesidad de implementación de algún tipo de medidas de control de este patógeno en las granjas porcinas argentinas. Sobre todo considerando la extensa capacidad de resistencia a antimicrobianos que suele ser frecuente en esta serovariedad, y que puede representar un importante riesgo para la producción porcina y la Salud Pública en Argentina.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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. 2007. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. *Emerging Infectious Diseases* 13 (5): 726-731.

Adley C., C. Dillon, C.P. Morris, N. Delappe, M. Cormican. 2011. Prevalence of *Salmonella* in pig ear pet treats. *Food Research International* 44: 193-197.

Alban L., H. Stege, J. Dahl. 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Preventive Veterinary Medicine* 53: 133-146.

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

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

Al-Sound W.A. y P. Radström. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and met. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4463-4470.

Arguello H., A. Carvajal, J.A. Collazos, C. García-Feliz, P. Rubio. 2012. Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International* 45: 905-912.

Arguello H., G. Sørensen, A. Carvajal, D.L. Baggesen, P. Rubio, K. Pedersen. 2013. Prevalence serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production. *Research in Veterinary Science* 95: 334-342.

Arnold M.E., J.J. Carrique-Mas, I. McLaren, R.H. Davies. 2011. A comparison of pooled and individual bird sampling for detection of *Salmonella* in commercial egg laying flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 99: 176-184.

Aury K., M. Chemaly, I. Petetin, S. Rouxel, M. Picherot, V. Michel, S. Le Bouquin. 2010. Prevalence and risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French breeding and fattening turkey flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 94: 84-93.

Bahnon P.B., P.J. Fedorka-Cray, S.R. Ladely, N.E. Mateus-Pinilla. 2006. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 76: 249-262.

Baptista F.M., L. Alban, A.K. Ersbøll, L.R. Nielsen. 2009. Factors affecting persistence of high *Salmonella* serology in Danish pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 92: 301-308.

Bearson B.L. y S.M.D. Bearson. 2011. Host specific differences alter the requirement for certain *Salmonella* genes during swine colonization. *Veterinary Microbiology* 150: 215-219.

Bearson S.M.D., H.K. Allen, B.L. Bearson, T. Looft, B.W. Brunelle, J.D. Kich, C.K. Tuggle, D.O. Bayles, D. Alt, U.Y. Levine, T.B. Stanton. 2013. Profiling the gastrointestinal microbiota in response to *Salmonella*: Low versus high *Salmonella* shedding in the natural porcine host. *Infection, Genetics and Evolution* 16: 330-340.

Beggesen D.L., L.R. Nielsen, G. Sørensen, R. Bødker, A.K. Ersbøll. 2007. Growth inhibitory factors in bovine faeces impairs detection of *Salmonella* Dublin by conventional culture procedure. *Journal of Applied Microbiology* 103: 650-656.

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

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

Bessa M.C., M. da Costa, M. Cardoso. 2004. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigeríficos do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 24 (2): 80-84.

Bolton D.J., C. Ivory, D. McDowell. 2013. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology* 160: 298-303.

Boyen F., F. Haesebrouck, D. Maes, F. Van Immerseel, R. Ducatelle, F. Pasmans. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130: 1-19.

BPEX. 2002. ZAP *Salmonella* – a zoonoses action plan for the British Pig Industry. Meat & Livestock Commission, Milton Keynes, UK. Disponible en: www.bpex.org.uk

Bronstein P.A., E.A. Miao, S.I. Miller. 2000. InvB is a Type III secretion chaperone specific for SspA. *Journal of Bacteriology* 182 (23): 6638-6644.

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

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

Caffer M.I., R. Terragno, N. Binsztein. 2008. 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: 1-76.

Caffer M.I., A. Alcain, M. Panagopulo, M. Moroni, M. Brengi, R. Terragno. 2010. Serovariedades de *Salmonella* spp. en Argentina, 2007-2009. XII Congreso Argentino de Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 8.

Campos J., M. Pichel, T.M.I. Vaz, A.T. Tavechio, S.A. Fernandes, N. Muñoz, C. Rodriguez, M.E. Realpe, J. Moreno, P. Araya, J. Fernández, A. Fernández, E. Campos, F. Duarte, N. WeilerGustafson, N. Binsztein, E. Pérez Gutierrez. 2012. Building PulseNet Latin America and Caribbean *Salmonella* regional database: First conclusions of genetic subtypes of *S. Typhi*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* circulating in six countries of the region. *Food Research International* 45: 1030-1036.

Cardinale E., S. Maeder, V. Porphyre, M. Debin. 2010. *Salmonella* in fattening pigs in Reunion Island: Herd prevalence and risk factors for infection. *Preventive Veterinary Medicine* 96: 281-285.

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

Carlson S.A., A.E. Barnhill, R.W. Griffith. 2012. *Salmonellosis*. En: *Diseases of Swine*, Tenth Edition. J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson (ed). Wiley-Blackwell. 821-840.

Carlsson U. y M. Elvander. 2012. Surveillance of infectious diseases in animals and humans in Sweden 2012, National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. SVA:s rapportserie 26 ISSN 1654-7098.

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

Christensen J., D.L. Baggesen, B. Nielsen, H. Stryhn. 2002. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study. *Veterinary Microbiology* 88: 175-188.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI document VET01-A3. Wayne, PA.

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

Cohen H.J., S.M. Mechanda, W. Lin. 1996. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4303-4308.

Correia-Gomes C., D. Mendonça, M. Vieira-Pinto, J. Niza-Ribeiro. 2013. Risk factors for *Salmonella* spp in Portuguese breeding pigs using a multilevel analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 108: 159-166.

Costa G., S. Oliveira, J. Torrison, S. Dee. 2011. Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic test using samples derived from experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology* 148: 246-251.

Côté S., A. Letellier, L. Lessard, S. Quessy. 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 68: 241-248.

Dahhan H., F. Shahada, T. Chuma, H. Moriki, K. Okamoto. 2010. Genetic analysis of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Stanley and Typhimurium from cattle. *Veterinary Microbiology* 145: 76-83.

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

Davies P.R., P.K. Turkson, J.A. Funk, M.A. Nichols, S.R. Ladely, P.J. Fedorka-Cray. 2000. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology* 89: 169-177.

De Busser E.V., D. Maes, K. Houf, J. Dewulf, H. Imberechts, S. Bertrand, L. De Zutter. 2011. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 145: 279-286.

De Busser E.V., D. Maes, K. Houf, J. Dewulf, L. De Zutter. 2013. Effect of the Enrichment Medium on the Detection and Diversity of *Salmonella* from Porcine Duodenal Content. *Foodborne Pathogens and Disease* 10 (2): 1-7.

de Vos C.J., H.W. Saatkamp, J. Ehlers. 2007. Simulation evaluation of *Salmonella* monitoring in finishing pigs in Lower Saxony, Germany. *Preventive Veterinary Medicine* 82: 123-137.

Doran J.L., S.K. Collinson, S.C. Clouthier, T.A. Cebula, W.H. Koch, J. Burian, PA. Banser, E.C. Todd, W.W. Kay. 1996. Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. *Molecular and Cellular Probes* 10 (4): 233-246.

Dorn-in S., R. Fries, P. Padungtod, M.N. Kyule, M.P.O. Baumann, L. Srikitjakarn, W. Chantong, A. Sanguangiat, K.H. Zessin. 2009. A cross-sectional study of *Salmonella* in pre-slaughter pigs in a production compartment of northern Thailand. *Preventive Veterinary Medicine* 88: 15-23.

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

European Food Safety Authority (EFSA). 2006b. Annex III of The EFSA Journal 2006, 341, Opinion on "Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production. Disponible en: www.efsa.eu.international

European Food Safety Authority (EFSA). 2008. 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: 1-111.

European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008, Part A. *The EFSA Journal* 7: 1-93.

European Food Safety Authority (EFSA). 2010. 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: 1-288.

European Food Safety Authority (EFSA). 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *The EFSA Journal* 2013 11 (4): 3129.

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

Eriksson E. y A. Aspan. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research*: doi:10.1186/1746-6148-3-21.

Farzan A., R.M. Friendship, C.E. Dewey, K. Warriner, C. Poppe, K. Klotins. 2006. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Preventive Veterinary Medicine* 73: 241-254.

Favier G.I., C.S.M. Lucero Estrada, V. Lazarte Otero, M.E. Escudero. 2013. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. *Food Control* 29: 49-54.

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

Fosse J., H. Seegers, C. Magras. 2009. Prevalence and Risk Factors for Bacterial Food-Borne Zoonotic Hazards in Slaughter Pigs: A Review. *Zoonoses and Public Health* 56: 429-454.

Funk J.A., P.R. Davies, M.A. Nichols. 2000. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12: 412-418.

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

Funk J. y W.A. Gebreyes. 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health Production* 12 (5): 246-251.

García-Feliz C., J.A. Collazos, A. Carvajal, A.B. Vidal, A. Aladueña, R. Ramiro, M. de la Fuente, M.A. Echeita, P. Rubio. 2007. *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health* 54: 294-300.

García-Feliz C., A. Carvajal, J.A. Collazos, P. Rubio. 2009. Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 91: 130-136.

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

Gebreyes W.A., P.R. Davies, W.E.M. Morrow, J.A. Funk, C. Altier. 2000. Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolates from Swine. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (12): 4633-4636.

Ghosh A.C. 1972. An epidemiological study of the incidence of salmonellas in pigs. *Journal of Hygiene Cambridge* 70: 151-160.

Gooch J.M. y R.L. Haddock. 1969. Swine salmonellosis in a Hawaiian piggery. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 154: 1051-1054.

Gormley F.J., C.L. Little, K.A. Grant, E. de Pinna, J. McLauchlin. 2010. 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 Microbiology* 27: 243-249.

Griffith R.W., K.J. Schwartz, D.K. Meyerholz. 2006. *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.: 739-754.

Guenther S., M. Filter, K. Tedin, I. Szab, L.H. Wieler, K. Nöckler, N. Walk, P. Schierack. 2010. Enterobacteriaceae populations during experimental *Salmonella* infection in pigs. *Veterinary Microbiology* 142: 352-360.

Hauser E., F. Hebner, E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, R. Prager, A. Schroeter, W. Rabsch, A. Fruth, B. Malorny. 2011. Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 151: 141-149.

Hautekiet V., V. Geert, V. Marc, G. Rony. 2008. Development of a sanitary risk index for *Salmonella* seroprevalence in Belgian pig farms. *Preventive Veterinary Medicine* 86: 75-92.

Hofshagen M., K. Nygard, K. Hauge. 2008. The surveillance and control programme for *Salmonella* in live animals, eggs and meat in Norway – Annual Report 2008: 1-10.

Horton R.A., G. Wu, K. Speed, S. Kidd, R. Davies, N.G. Coldham, J.P. Duff. 2013. Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Research in Veterinary Science* 95: 45-48.

Hur J., C. Jawale, J.H. Lee. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International* 45: 819-830.

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

Iglesias D.H. y G. Ghezan. 2013. Análisis de la cadena de la carne porcina en Argentina. Estudios socioeconómicos de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales N° 12. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ISSN 1852-4605.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2004. Plan tecnológico regional 2006-2008 - Informe diagnóstico de situación cadena porcinos.

Jackson B.R., P.M. Griffin, D. Cole, K.A. Walsh, S.J. Chai. 2013. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases* 19 (8): 1239-1244.

Jensen A., A. Dalsgaard, A. Stockmarr, E. Møller Nielsen, D.L. Baggesen. 2006. Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3): 1833-1842.

Jensen A.N., L.R. Nielsen, D.L. Baggesen. 2013. Use of real-time PCR on faecal samples for detection of sub-clinical *Salmonella* infection in cattle did not improve the detection sensitivity compared to conventional bacteriology. *Veterinary Microbiology* 163: 373-377.

Johansen M., A. Stockmarr, C.S. Kristensen, P. Baekbo, J.P Nielsen, H. Stege, K.S. Pedersen. 2010. Effect of diarrhea on average daily weight gain in grower-finisher pigs. *Proceedings of the 21th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*, Canada 2010, p. 237.

Kaneene J.B., R. Miller, K. May, J.A. Hattey. 2010. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Oranienburg in Michigan dairy calves. *Foodborne Pathogens and Disease* 7 (10): 1193-1201.

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

Kich J.D., A. Coldebella, N. Morés, M. Gomes Nogueira, M. Cardoso, P.M. Fratamico, J.E. Call, P. Fedorka-Cray, J.B. Luchansky. 2011. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 151: 307-313.

Kim A., J.Y. Lee, C.T. Lim, K. Lee, S.C. Jung, K.Y. Chang. 2012. Serodiversity and virulence genes of *Salmonella* serovars from finished pigs in Korea. *Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Korea 2012*, p 722.

Koyuncu S. y P. Haggblom. 2009. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. *BMC Veterinary Research* 5:6 doi:10.1186/1746-6148-5-6

Kranker S., L. Alban, J. Boes, J. Dahl. 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2282-2288.

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

Lakshmaiah V., M.S. Arun, A. Malini, S.R. Prasad. 2009. Polyserositis due to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. doi:10.1016/j.trstmh.2009.01.024.

Lawson L.G., J.D. Jensen, P. Christiansen, M. Lund. 2009. Cost-effectiveness of *Salmonella* reduction in Danish abattoirs. *International Journal of Food Microbiology* 134: 126-132.

Li R., J. Lai, Y. Wang, S. Liu, Y. Li, K. Liu, J. Shen, C. Wu. 2013. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International Journal of Food Microbiology* 163: 14-18.

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

Lo Fo Wong D.M.A., J. Dahl, H. Stege, P.J. van der Wolf, L. Leontides, A. von Altrock, B.M. Thorberg. 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 62: 253-266.

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

Loynachan A.T. y D.L. Harris. 2005. Dose determination for acute *Salmonella* infection in pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5): 2753-2755.

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

Majtan J., L. Majtanova, V. Majtan. 2010. Increasing trend of resistance to nalidixic acid and emerging ceftriaxone and ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Slovakia, 2005 to 2009. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 68: 86-88

Malorny B., J. Hoorfar, C. Bunge, R. Helmuth. 2003a. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1): 290-296.

Malorny B., J. Hoorfar, M. Hugas, A. Heuvelink, P. Fach, L. Ellerbrock, C. Bunge, C. Dorn, R. Helmut. 2003b. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR based method. *International Journal of Food Microbiology* 89: 241-249.

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (MAGPyA). 2013. INFORME PORCINOS N°7 - Julio 2013. Disponible en: <http://64.76.123.202/site/ganaderia/porcinos/>

Malorny B. y J. Hoorfar. 2005. Toward Standardization of Diagnostic PCR Testing of Fecal Samples: Lessons from the Detection of *Salmonellae* in Pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (7): 3033-3037.

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

McDowell S.W.J., R. Porter, R. Madden, B. Cooper, S.D. Neill. 2007. *Salmonella* in slaughter pigs in Northern Ireland: Prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects. *International Journal of Food Microbiology* 118: 116-125.

Merle R., S. Kösters, T. May, U. Portscht, T. Blaha, L. Kreienbrock. 2011. Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: Results of the years 2003–2008. *Preventive Veterinary Medicine* 99: 229-233.

Methner U., N. Rammler, K. Fehlhaber, U. Rösler. 2011. *Salmonella* status of pigs at slaughter — Bacteriological and serological analysis. *International Journal of Food Microbiology* 151: 15-20.

Miller G., X. Liu, P. McNamara, D. Barber. 2005. Influence of *Salmonella* in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *Journal of Food Protection* 68: 1788-1798.

Møgelmoose V., B. Nielsen, J. Bagger, K. Pihl, V. Nielsen. 2000. Eradication of multi-resistant *Salmonella* typhimurium dt104 infections in danish swine herds. *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*, Melbourne, Australia, p 216.

Moreno A. y J.M. Telechea. 2011. Monitoreo y estudio de cadenas de valor ONCCA – Informe de la cadena porcina. 1-23.

Mousing J., P.T. Jensen, C. Halgaard, F. Bager, N. Feld, B. Nielsen, J.P. Nielsen, S. BechNielsen. 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine* 29: 247-261.

Muirhead M.R. y 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. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LI: 263-273.

Myint M.S., Y.J. Johnsona, N.L. Tablantea, R.A. Heckert. 2006. 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 Microbiology* 23: 599-604.

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

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

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

Olive D. y P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal Clinical Microbiology* 37: 1661-1669.

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

Oliveira L.G., L.F.O.S. Carvalho, G.C.I.H. Masson, M.A.R. Feliciano. 2010. Infecção experimental por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo Panama e tentativa de transmissão nasonasal em leitões desmamados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62 (6): 1340-1347.

Paphitou N.I. 2013. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42S: S25-S28.

Parada J., A.I. Carranza, P.J. Tamiozzo, B.R. Pelliza, A. Ambrogi. 2008. Comparación de la sensibilidad de la detección bacteriológica de *Salmonella* spp en cerdos vivos y a matadero. XVII Reunión Científica Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD). Argentina. p. B45.

Parada J., A.I. Carranza, M. Pichel, P.J. Tamiozzo, B.R. Pelliza, A. Ambrogi. 2013. *Salmonella* transmission from the gilt to her offspring. *Livestock Science* 157: 605-61.

Phillips N.D., T. La, P.J. Adams, B.L. Harland, S.G. Fenwick, D.J. Hampson. 2009. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Veterinary Microbiology* 134: 294-299.

Pires A.F.A., J.A. Funk, C.A. Bolin. 2012. Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. *Epidemiology and Infection*. doi:10.1017/S0950268812002464.

Plym Forshell L. y M. Wierup. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties* 25 (2): 541-554.

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

Rahn K., S.A. De Grandis, R.C. Clarke, S.A. McEwen, J.E. Galán, C. Ginocchio, R. Curtiss III, C.L. Gyles. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6: 271-279.

Ramirez A., C. Wang, J.R. Prickett, R. Pogranichniy, K.J. Yoon, R. Main, J.K. Johnson, C. Rademacher, M. Hoogland, P. Hoffmann, A. Kurtz, E. Kurtz, J. Zimmerman. 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive Veterinary Medicine* 104: 292-300.

Ramos Moreno A.C., A. Fernandes Filho, T. do Amaral Tardelli Gomes, S.T.S. Ramos, L.P.G. Montemor, V.C. Tavares, L. dos Santos Filho, K. Irino, M. Baquerizo Martinez. 2010. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66: 50-57.

Ribot E.M., M.A. Fair, R. Gautom, D.N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, T. J. Barrett. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Diseases* 3 (1): 59-67.

Rijpens N., L. Herman, F. Vereecken, G. Jannes, J. De Smedt, L. De Zutter. 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *International Journal of Food Microbiology* 46: 37-44.

Rincón M.A., D.C. Mejía, J.D. Mogollón. 2008. Implementation of microbiological methods in slaughterhouses for detection of *Salmonella* sp. in pig carcasses. *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*, South Africa 2008, p 329.

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

Salmon D.E. y T. Smith. 1986. The bacterium of swine plague. *Am. Mongr. Microbiology Journal* 7: 204.

Sanchez J., I.R. Dohoo, J. Christensen, A. Rajic. 2007. Factors influencing the prevalence of *Salmonella* spp. in swine farms: A meta-analysis approach. *Preventive Veterinary Medicine* 81: 148-177.

Sandt C.H., D.A. Krouse, C.R. Cook, A.L. Hackman, W.A. Chmielecki, N.G. Warren. 2006. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (9): 3208-12.

Schulze T., A. Ludtke, I. Rahlff, P-U Tunn, P. Hohenberger. 2009. *Salmonella* osteomyelitis in an immunocompromized patient presenting as a primary lymphoma of the bone. *International Journal of Infectious Diseases* 13: e67-e70.

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

Schwarz P., J. Calveira, A. Sella, M. Bessa, D.E.S.N. Barcellos, M. Cardoso. 2009. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61 (5): 1028-1034.

Sha Q., A. Gunathilake, M.R.J. Forstner, D. Hahn. 2011. Temporal analyses of the distribution and diversity of *Salmonella* in natural biofilms. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 353-359.

Sistema Integrado de Gestión Sanitaria en Sanidad Animal (SIGSA). 2013. - Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales – SENASA. Disponible en: http://www.senasa.gov.ar/indicadores.php?d=3_Indicadores_Ganaderia_Porcina&in=1

Silva L.E.; C.P. Gotardi; R. Vozzotto; J.D. Kich; M.R.I. Cardoso. 2006. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul de Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58 (4): 455-461.

Silva M.C., G. Silva Faria, D.A. Jesus de Paula, R. Prado Martins, J. Garcia Caramori Junior, J.D. Kich, E.M. Colodel, L. Nakazato, V. Dutra. 2009. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. *Ciência Rural*, Santa Maria 39 (1): 266-268.

Smith H. y J. Jones. 1967. Observations on experimental oral infection with *Salmonella Dublin* in calves and *S. choleraesuis* in pigs. *Journal of Pathology* 93: 141-156.

Son I., J. Zheng, C.E. Keys, S. Zhao, J. Meng, E.W. Brown. 2013. Analysis of pulsed field gel electrophoresis profiles using multiple enzymes for predicting potential source reservoirs for strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from humans. *Infection, Genetics and Evolution* 16: 226–233.

Spector M.P. y W.J. Kenyon. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International* 45: 455-481.

Stone G.G., R.D. Oberst, M.P. Hays, S. Mcvey, M.M. Chengappa. 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (7): 1742-1749.

Swaminathan B. y T. Barrett. 1992. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. *Journal of Microbiology Methods* 23: 129-139.

Swaminathan B.; T. Barrett; S. Hunter; R. Tauxe. 2001. Pulsenet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases* 7: 382-389.

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

Tenover, F.C.; R.D. Arbeit; R.V. Goering; P.A. Mickelsen; B.E. Murray; D.H. Persing; B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (9): 2233–2239.

Torres G.J., F.J. Piquera, L. Algarra, C. de Frutos, O.J. Sobrino. 2011. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. *Preventive Veterinary Medicine* 98: 81-87.

Trevanich S., S. Tiyapongpattana, T. Miyamoto. 2010. Application of an optimized 18-h method involving one-step culturing and single primer-based PCR assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Food Control* 21: 593-598.

Valayatham V. 2009. *Salmonella*: the pelvic masquerader. *International Journal of Infectious Diseases* 13: e53-e55.

van der Wolf P.J., W.B. Wolbersa, A.R.W. Elbersa, H.M.J.F. van der Heijdenb, J.M.C.C. Koppena, W.A. Hunnemana, F.W. van Schiea, M.J.M. Tielen. 2001. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology* 78: 205-219.

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

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

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

Vieira-Pinto M., M. Olivera, J. Aranha, C. Martins, F. Bernardo. 2008. Influence of an enrichment step on *Salmonella* sp. detection by fluorescent *in situ* hybridization on pork samples. *Food Control* 19: 286-290.

Visscher C.F., G. Klein, J. Verspohl, M. Beyerbach, J. Stratmann-Selke, J. Kamphues. 2011. Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in abattoirs in Lower Saxony, Germany. *International Journal of Food Microbiology* 146: 44-51.

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. 2009. *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 Pathogens and Disease* 6 (8): 965-972.

Villamil A, G. González, A. Ruiz. 2012. Clonal diversity of *Salmonella* spp. strains isolated from Chilean swine farms. *Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*, Korea 2012, p 173.

Vo A.T.T., E. van Duijkeren, A.C. Fluit, M.E.O.C. Heck, A. Verbruggen, H.M.E. Maas, W. Gaastra. 2006. Distribution of *Salmonella enterica* serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90. *Veterinary Microbiology* 113: 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. 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by Nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 38 (3): S127-134.

Vyt P., K. De Waele, N. Nollet, P. Heylen, D. Maes. 2006. Effect of transport and holding on *Salmonella* shedding in slaughter pigs. *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*, Copenhagen, Denmark, Volume 1. Abstract N° O.40-04.

Walters M. y V. Sperandio. 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Review. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 125-131.

Weigel R.M., B. Qiao, B. Teferedegne, D.K. Suha, D.A. Barber, R.E. Isaacson, B.A. White. 2004. 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*. *Veterinary Microbiology* 100: 205-217.

Weiss L.H.N., R.B. Nonig, M. Cardoso, M. da Costa. 2002. Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 22(3): 104-108.

Werber D., J. Dreesman, F. Feil, U. van Treeck, G. Fell, S. Ethelberg, A.M. Hauri, P. Roggentin, R. Prager, I.S.T. Fisher, S.C. Behnke, E. Bartelt, E. Weise, A. Ellis, A. Siitonen, Y. Andersson, H. Tschäpe, M.H. Kramer, A. Ammon. 2005. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infectious Diseases* 5 (7): doi:10.1186/1471-2334-5-7.

Wilcock B.P., C.H. Armstrong, H.J. Olander. 1976. The significance of the serotype in the clinical and pathologic features of naturally occurring porcine salmonellosis. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 40: 80-88.

Wilcock B.P. y K.J. Schwartz. 1992. 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: 570-583.

Wilkins W., S. Parker, L. Waddell, J. Sanchez, J. Sargeant, C. Waldner. 2010. Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for *Salmonella* spp. in swine: a systematic review/Meta-regression approach. *Zoonoses Public Health* 57 (1): 121-134.

Williams D.R., D. Hunter, J. Binde, E. Hough. 1981. Observations on the occurrence of *Salmonella* Choleraesuis and other *Salmonellas* in two herds of feeder pigs. *Journal of Hygiene Cambridge* 86: 369-377.

Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied Environmental Microbiology* 63 (10): 3741-3751.

Wise M.G., G.R. Siragusa, J. Plumblee, M. Healy, P.J. Cray, B.S. Seal. 2009. Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. *Journal of Microbiological Methods* 76: 18-24.

Yeh K.S., T.H. Chen, C.W. Liao, C.S. Chang, H.C. Lo. 2002. PCR amplification of the *Salmonella Typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species. *International Journal of Food Microbiology* 78 (3): 227-234.

Zheng D.M., M. Bonde, J.T. Sørensen. 2007. Associations between the proportion of *Salmonella* seropositive slaughter pigs and the presence of herd level risk factors for introduction and transmission of *Salmonella* in 34 Danish organic, outdoor (non-organic) and indoor finishing-pig farms. *Livestock Science* 106: 189-199.